

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory (B3912)

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů (BMOBIBO)



Eliška Zobalová

Pseudotypování u bakulovirů

Pseudotyping in baculoviruses

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2019

Charles University

Faculty of Science

Poděkování

Především bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Španielové, Ph.D za cenné rady, odbornou pomoc a nekonečnou trpělivost.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha, 9. 5. 2019

Eliška Zobalová

Abstrakt

Bakuloviry jsou obalené DNA viry, které infikují larvální stadia členovců, především hmyzu. Bakuloviry mají široké použití v biotechnologiích. Jsou využívány jako biologické pesticidy a expresní vektory pro produkci proteinů v hmyzích buňkách. Jsou však schopny vstupovat i do savčích buněk a dopravovat geny pro expresi řízenou z promotorů, které jsou v příslušných buňkách aktivní. Rekombinací nebo pseudotypováním mohou vznikat bakuloviry, které mají vyšší schopnost transdukce nebo rozeznávají specifické savčí buňky. Tato bakalářská práce podrobně popisuje fenomén pseudotypování u virů a shrnuje publikovaná data o využití pseudotypovaných bakulovirů pro genovou terapii a vakcinace.

Klíčová slova: bakulovirus, pseudotypování, genová terapie, vakcína, GP64, VSV

Abstract

The baculoviruses are a group of enveloped DNA viruses that infect the larval stage of arthropods, mainly insects. They are widely used in biotechnology and well known for their utility as biological pesticides and gene expression vectors for the production of proteins in insect cells and larvae. However, they are also able to enter in mammalian cells and deliver-genes for expression under the control of mammalian cell-active promoters. Recombination or pseudotyping can result in formation of baculoviruses that provide a higher transduction frequency or are able to recognize specific mammalian cells. This bachelor thesis describes the phenomenon of viral pseudotyping and summarizes published information about the use of pseudotyped baculoviruses for gene therapy and vaccination.

Key words: baculovirus, pseudotyping, gene therapy, vaccine, GP64, VSV

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Virus.....	1
3. Pseudotypování	2
3.1. Historie pseudotypování.....	2
3.2. Využití pseudotypování v biotechnologiích	2
4. Bakuloviry	3
4.1. Struktura bakulovirů.....	4
4.2. Životní cyklus bakulovirů	5
4.3. Využití bakulovirů.....	6
4.4. Expresní systémy bakulovirů	7
4.4.1. Bac-to-bac	8
4.4.2. BacMam	8
4.4.3. MultiBacMam	8
4.4.4. MultiBac.....	8
5. Pseudotypování bakulovirů	9
5.1. Bakuloviry jako nástroj v genové terapii.....	11
5.2. Vakcinace s využitím pseudotypovaných bakulovirů	15
5.2.1. Aujeszkyho choroba	15
5.2.2. Virus prasečího reprodukčního a respiračního syndromu	16
5.2.3. Prasečí circovirus typu 2	16
5.2.4. Bivalentní vakcína proti PRRSV a PCV2	17
5.2.5. Klasický mor prasat.....	18
5.2.6. Vzteklna	19
5.2.7. Japonská encefalitida.....	20
5.2.8. Západonilský virus	21
5.2.9. Slintavka a kulkavka	22
5.2.10. Drůbeží burzitida.....	23
5.2.11. Ptačí chřipka.....	24
5.2.12. Virus chřipky	24
5.2.13. Toxoplasma gondie	25
5.2.14. HIV	26
5.2.15. Malárie.....	27
6. Závěr.....	28
7. Seznam použité literatury	29

Seznam zkratek

AAV	adenovirus	<i>adenovirus</i>
AcMNPV	---	<i>Autographa californica multicausid nucleopolyhedrovirus</i>
ADP	adenosindifosfát	<i>adenosine diphosphate</i>
AdV	adeno asociované viry	<i>adeno associated virus</i>
AI	ptačí chřipka	<i>avian influenza</i>
AIDS	syndrom získaného selhání imunity	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Bac	bakulovirus	<i>baculovirus</i>
BEVS	bakulovirový expresní systém	<i>baculovirus expression vector system</i>
BLC2	B-buněčný lymfom-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
BmNPV	---	<i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i>
BV	pučící virion	<i>budded virion</i>
CAG	hybridní konstrukt skládající se z cytomegalovirového zesilovače zřizovaného s kuřecím beta-aktinovým promotorem	<i>hybrid construct consisting of the cytomegalovirus (CMV) enhancer fused to the chicken beta-actin promoter</i>
Cap	kapsidový protein	<i>capsid protein</i>
CPK	buněčná linie prasečích ledvin	<i>porcine kidney cell</i>
CFTR	---	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CMV	---	<i>cytomegalovirus</i>
CSFV	klasický vir prasat	<i>classical swine fever virus</i>
ds	dvouvláknové	<i>double-strand</i>
DT-A	difterický toxin A	<i>diphtheria toxin A</i>
E	obalový protein	<i>envelope protein</i>
EGFP	vylepšený zelený fluorescenční protein	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FMD	slintavka a kulhavka	<i>foot and mouth disease</i>
FMDV	virus slintavky a kulhavky	<i>foot and mouth disease virus</i>
GFAP	---	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	zelený fluorescenční protein	<i>green fluorescent protein</i>
GP	glykoprotein	<i>glycoprotein</i>
HA	hemaglutinin	<i>hemagglutinin</i>
HIV	virus lidské imunodeficiency	<i>human immunodeficiency virus</i>
HSV	---	<i>herpes simplex virus</i>
IBDV	virus infekční burzitidy drůbeže	<i>infectious bursal disease virus</i>
IFN-γ	interferon gama	<i>interferon gama</i>
Ig	protilátka	<i>immunoglobulin</i>
IRI	ischemicko-reperfúzní poškození	<i>ischemia-reperfusion injury</i>
ITR	invertované terminální repete	<i>inverted terminal repeats</i>
JEV	virus japonské encefalitidy	<i>japanese encephalitis virus</i>
LDL	nízkodenzitní lipoprotein	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	receptor pro nízkodenzitní lipoprotein	<i>low density lipoprotein receptor</i>
NA	neuraminidáza	<i>neuraminidase</i>
NES1	---	<i>normal epithelial cell specific-1</i>

OB	okluzní tělísko	<i>occlusion body</i>
ODV	virion odvozený od okluze	<i>occlusion derived virus</i>
ORF	otevřený čtecí rámec	<i>open reading frame</i>
PBS	fyzilogický roztok pufrovaného fosfátu	<i>phosphate Buffered Saline</i>
PCV2	prasečí cirovirus typu 2	<i>porcine.circovirus type 2</i>
PFU	plak tvořící jednotka	<i>plaque forming unit</i>
PMWS	syndrom multisystémového chřadnutí selat po odstavu	<i>postweaning multisystemic wasting syndrom</i>
PRRS	prasečí reprodukční a respirační syndrom	<i>porcine reproductive and respiratory syndrome</i>
prM	premembránový protein	<i>pre-membrane protein</i>
PrV		<i>pseudorabies</i>
RABV	virus vztekliny	<i>rabies virus</i>
ROS	reaktivní forma kyslíku	<i>reactive oxygen species</i>
RVG	glykoprotein viru vztekliny	<i>rabies virus glycoprotein</i>
ss	jednovláknové	<i>single-strand</i>
VSV	virus vesikulární stomatitidy	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-G	G-glykoprotein viru vesikulární stomatitidy	<i>vesicular stomatitis virus G glycoprotein</i>
VSV-GED	ektodoména 21-aminokyselin s transmembránovou cytoplazmatickou koncovou doménou VSV-G	<i>21-amino-acid ectodomain with transmembrane and cytoplasmic tail domains of VSV-G</i>
WHO	světová zdravotnická organizace	<i>World Health Organization</i>
WNV	západonilský virus	<i>west nile virus</i>

1. Úvod

Bakuloviry jsou obalené DNA viry, které jsou schopny infikovat více jak 500 druhů hmyzu a z toho je více jak 40 motýlů. Přes 600 druhů bakulovirů je rozděleno do čtyř rodů-*Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* a *Deltabaculovirus*. Svůj název mají odvozený z latinského „*baculum*“, což znamená hůl podle jejich tvaru.

Bylo prokázáno, že rekombinantní bakuloviry nesoucí cizorodé geny pod vhodným savčím promotorem a enhancerem můžou vstupovat do savčích buněk a zajistit jejich expresi. Nejběžněji používaným bakulovirovým expresním systémem je systém odvozený od *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). V genové terapii byl bakulovirus použit již v několika studiích, nejčastěji jako protinádorové terapeutikum. Například byl využit jako vektor exprimující toxin proti růstu buněk maligního gliomu v mozku. Často jsou bakuloviry využívány ve vakcinologii, kde modifikované rekombinantní bakuloviry vyvolávají hostitelskou imunitní odpověď, která následně chrání organismus před smrtelnou infekcí způsobenou nebezpečnými viry, bakteriemi nebo jinými parazity. Výhodou je, že se bakuloviry nejsou schopny replikovat v savčích buňkách a jejich použití je tedy bezpečné.

Bakuloviry lze snadno kultivovat a geneticky s nimi manipulovat a jejich replikační potenciál lze dobře zvyšovat cílenými úpravami. Mezi takové modifikace může patřit úprava jejich povrchových proteinů mj. postupy, které vedou ke vzniku pseudotypovaných virů. Cílem této práce proto bylo podat přehled o možnostech, které pseudotypování pro bakuloviry nabízí a shrnout dostupnou literaturu o použití tohoto přístupu v biomedicině.

2. Virus

Virus je intracelulární parazit, který pro svoji existenci vyžaduje hostitele. Hostitel zajišťuje šíření viru a pomnožení viru. Virion je kompletní částice viru, která je důležitá pro dodávání genomu do hostitelské buňky. Viry můžeme odlišit podle velikosti, složení a struktury genomu, ale i podle způsobu replikace. Uvnitř viru se nachází virový genom, často ve spojení s virovými proteiny a tvoří pak tzv. nucleocore. Genomem viru může být DNA nebo RNA v jednovláknové (ss), dvouvláknové (ds) podobě a v lineární nebo kruhové konformaci. Díky tomu, že mohou mít různorodý typ genomu využívají různé replikační strategie. Kapsidové proteiny u viru slouží jako ochranný obal genomu (případně nucleocore), které jsou složeny do kapsidy. Kapsidy obsahují jeden nebo několik kapsidových proteinů. Podle morfologie rozlišujeme helikální a ikosahedrální kapsidovou strukturu viru. Některé viry obsahují další obal, který je složen z virových glykoproteinů a z membrán hostitelské buňky. Můžeme tedy také rozdělit viry na obalené a neobalené (Gelderblom, 1996).

3. Pseudotypování

Pseudotypování, neboli fenotypové míchání, vede ke vzniku virových chimér. Je to proces, kdy je genom jednoho viru zabalen do vlastních obalových glykoproteinů spolu s glykoproteiny druhého viru. Vznik pseudotypovaných částic může probíhat během dvojí infekce příbuzných, ale i nepříbuzných virů, kdy dochází k míchání obalových glykoproteinů (Závada, 1982). V ko-infikované buňce pak virové proteiny pocházející z odlišných virů vykazují ko-lokalizaci a při pučení virionů se inkorporují do jednoho virionu (Briggs et al., 2003). Nemusí to být jenom obalové glykoproteiny obalených virů, ale také kapsidové bílkoviny virů nebalených (Sanders, 2002). Jan Závada také definoval „čistě pseudotypování“, kdy genom a vnitřní proteiny pocházejí z jednoho viru, ale všechny obalové glykoproteiny patří viru jinému (Závada, 1982). Tyto fenotypové změny nejsou dědičné (Carnell et al., 2015). Virus je schopný inkorporovat do své obálky jak svoje, tak cizí glykoproteiny i buněčné proteiny. Tyto buněčné proteiny může ale také vyloučit ze zralých virionů, protože je rozezná jako cizí. Tento proces nazval Jan Závada jako pseudotypní paradox (Závada, 1982). Pseudotypované viry mají svoje výhody např. lepší schopnost šíření virů, lepší adaptace virů na hostitele (Briggs et al., 2003), změny tropismu a stability viru (Sanders, 2002).

3.1. Historie pseudotypování

Od doby, kdy byl poprvé použit termín pseudotypování, což bylo skoro před 50 lety, se tento unikátní proces prokázal jako účinný nástroj v oblasti biotechnologií. Roku 1970 byla publikována první práce, která popsala fenomén vzniku pseudotypů mezi virem parainfluenzi SV5 a virem vesikulární stomatitidy. Infikovaná buňka poskytovala nejen rodičovské typy virů, ale také fenotypově smíchané viriony (Choppin and Compans, 1970). Byl to také náš český molekulární onkolog Jan Závada, který se této problematice věnoval. V rámci výzkumu infikoval myši buňky retrovirem myšího sarkomu a kuřecí buňky virem ptačí myeloblastózy a poté obě tyto linie virem vesikulární stomatitidy. Vytvořily se pseudotypované částice VSV obsahující na povrchu virionů antigeny myšího sarkomu a ptačí myeloblastózy (Závada, 1972). O rok později publikoval podobná pozorování (tvorbu pseudotypů VSV s obalovými proteiny jiných RNA nádorových virů) tým Davida Baltimore (Huang et al., 1973).

3.2. Využití pseudotypování v biotechnologiích

Fenomén pseudotypování využívají mezi sebou RNA viry, jak to prokázal roku 1972 Závada, kdy pseudotypoval virus vesikulární stomatitidy s RNA nádorovými viry a roku 1970 Choppin a

Compans, kdy vytvořili fenotypově smíchané viriony VSV s parainfluenzou SV5. Pseudotypovat ale také můžeme RNA s DNA viry, i když nemají podobnou velikost ani vnitřní organizaci (Pickl et al., 2001). Například Anderson et al., 2000 vytvořili pseudotypovaný herpes simplex virus s G glykoproteinem vesikulární stomatitidy. Pseudotypování má mnoho možných klinických i experimentálních aplikací. Jedním z nejdůležitějších cílů při řízeném pseudotypování je snaha o dosažení změn tropismu viru. Tropismus je nejčastěji určován specifickou interakcí povrchových proteinů virů s receptorovými molekulami na povrchu buňky. Tropismus určuje schopnost viru poškodit nebo infikovat určitou skupinu buněk nebo tkání. Po navázání viru na buňku dochází u obalených virů většinou k membránové fúzi. Ta může, ale nemusí, být závislá na změně pH. Fúze závislá na změně pH probíhá tak, že virus vstupuje receptorem zprostředkovanou endocytózou do buňky a nízké pH endosomu vyvolá takové konformační změny povrchových proteinů viru, které navodí jejich fúzní aktivitu. V případě fúze nezávislé na pH dochází ke konformační změně povrchových virových proteinů v důsledku vazby na specifické receptory, které pak vlastně vyvolají fúzní aktivitu (Morizono and Chen, 2011). Díky pseudotypování lze omezit, nebo naopak rozšířit, tento jev na určitou skupinu cílových buněk. Je to například změna tropismu lentivirů, které mají široké spektrum tropismu. Díky pseudotypování lentiviru s virem vztekliny, můžeme ovlivnit tropismus pouze na specifickou cílovou skupinu buněk, v tomto případě na centrální nervový systém (Cronin et al., 2005). Proces pseudotypování můžeme také využít při vytváření vakcín v genovém inženýrství a v genové terapii můžeme snížit patogenitu tím, že se nahradí membránové proteiny patogenního viru za proteiny bezpečnějšího a nepatogenního viru (Sanders, 2002).

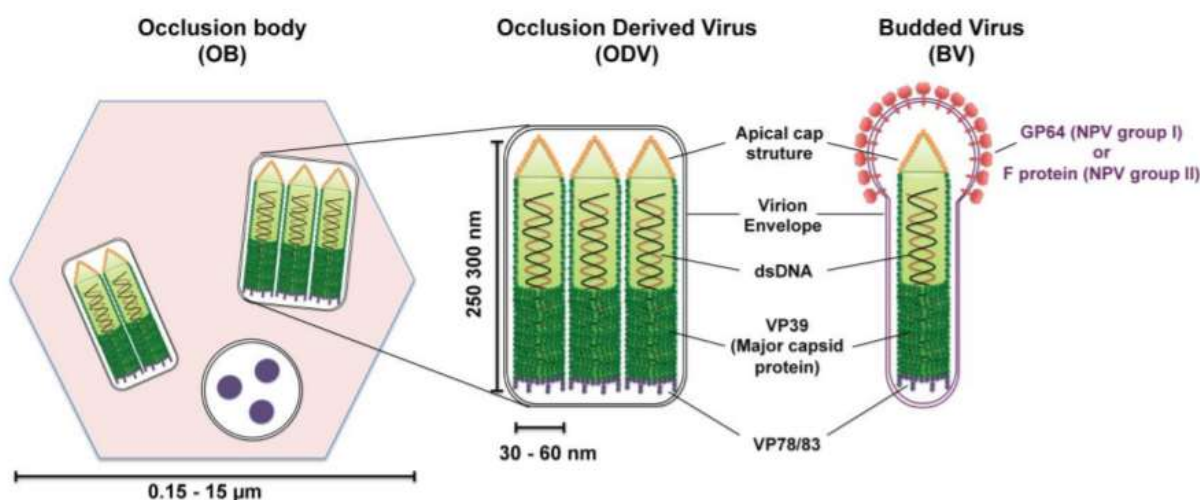
4. Bakuloviry

Bakuloviry jsou hmyzí viry s genomem tvořeným kruhovou dvouvláknovou DNA o velikosti 80-180 kpb a kódující podle druhu 100-180 proteinů. Viriony mají tyčinkovitý tvar, velikosti 30-60 nm na šířku a 250-300 nm na délku a jsou obalené. Bakuloviry se dělí do čtyř rodů-*Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* a *Deltabaculovirus*, dohromady čítající přes 600 druhů bakulovirů. Jednotlivé skupiny bakulovirů napadají larvy hmyzu z řádu-*Lepidoptera*, *Diptera* a *Hymenoptera* (Makkonen et al., 2015).

Nejprostudovanějším bakulovirem je *Autographa californica* (AcMNPV). AcMNPV má kruhový dvouvláknový genom, který obsahuje 133 894 páru bází. Díky schopnosti infekce savčích buněk, ale neschopnosti replikovat se v nich, je vhodným kandidátem pro využití v genové terapii (Makkonen et al., 2015). Také pro jeho velký genom má rovněž velké kapacitní možnosti pro uložení cizí DNA, je možné do něj uložit i více genů. To jsou hlavní důvody proč se AcMNPV nejčastěji používá v laboratořích (Felberbaum, 2015).

4.1. Struktura bakulovirů

V průběhu životního cyklu bakulovirů vznikají dva typy virionů: ODV (occlusion-derived virus) a BV (budded virion). Viriony se liší v účinnosti infekce u různých tkání, složením a původem obalu virionů. ODV jsou uloženy v proteinových krystalech velkých 0,15-15 μm , tzv. okluzních tělíscích (OB z anglického occlusion body). Proteinový krystal obklopující ODV se skládá z jediného virového proteinu polyhedrinu (Clem and Passarelli, 2013). Okluzní tělíska jsou velmi stabilní a ODV v těchto okluzích může vydržet mimo hostitele až několik let. Jsou ale nestabilní v alkalickém prostředí střeva hostitele a dochází tak k uvolnění virionů z okluzních tělísek. Tím je zahájena infekce hmyzu a virus infikuje epiteliální buňky středního střeva. ODV jsou tedy zodpovědné za primární infekci hmyzu a za horizontální přenos mezi hmyzem. Po první replikaci ODV v buňce hostitele vznikají BV způsobující systémové šíření viru ve hmyzu, tedy sekundární infekci (Makkonen et al., 2015). BV se nachází prakticky v celém těle hmyzu, kde je neutrální prostředí. BV se vytvářejí v počáteční fázi replikace a jejich obal pochází z modifikované plazmatické membrány hostitelské buňky, která obsahuje virové fúzogení proteiny GP64 nebo F, jenž usnadňují vstup do buněk endocytózou. BV obsahuje pouze jednu nukleokapsidu. Ve velmi pozdní fázi replikace vznikají ODV, které jsou obalené v membráně, jenž je sestavena v jádře a je do ní zabaleno více nukleokapsid. ODV neobsahuje na svém povrchu žádné fúzogení proteiny, jako BV (Pearson and Rohrmann, 2002). U obou druhů virionů má nukleokapsida tyčinkovitý tvar s odlišným apikálním a basálním koncem se spiralizovanou dvouvláknovou kruhovou DNA uvnitř. Nukleokapsida obsahuje řadu proteinů, které se u ODV a BV shodují nebo také liší. Hlavním kapsidovým proteinem u obou virionů je VP39, který tvoří kostru nukleokapsidy (Au et al., 2013).



Obr.1: Typy virionů (převzato ze Au et al., 2013)

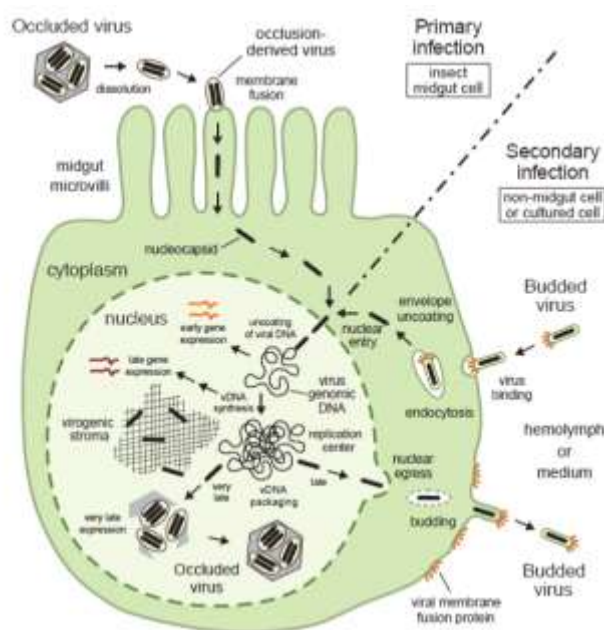
Fúzogenní proteiny zprostředkovávají vstup viru do hostitelské buňky pomocí receptorem zprostředkované fúze membrán. Ukázalo se, že všechny bakuloviry obsahují F protein. Některé ho využívají jako fúzogenní protein, jiné získaly fúzogenní protein GP64 a F protein zde působí jako zbytkový protein bez specifické funkce. Podle toho, jaký používá bakulovirus fúzogenní protein, jestli GP64 nebo F protein, jsou rozděleny do dvou skupin (Pidre et al., 2013). Tyto proteiny jsou závislé na pH a jsou důležité při interakci a fúzi během vstupu (Blissard and Wenz, 1992), ale také hrají roli při pučení BV z buňky. GP64 nejprve zprostředkovává připojení viru na receptory buněčné membrány. Poté, co projde virus endosomem, který má nízké pH, dojde ke změně konformace GP64 a splnutí obalu viru s povrchem endosomu, a tím se uvolní nukleokapsida do cytoplasmy (Hefferon et al., 1999). Virový obal s fúzogenními proteiny se recykluje a putuje zpět na buněčnou membránu, do které se opět vzniklé viriony zabalí (Pidre et al., 2013).

4.2. Životní cyklus bakulovirů

Infekci způsobenou bakuloviry můžeme rozdělit na tři fáze: časná (0-6 hod. po infekci), pozdní (6-24 hod. po infekci) a velmi pozdní (18-24 až 72 hod. po infekci) (Knipe and Howley, 2007). Životní cyklus bakuloviru je započat v okamžiku, kdy larva hmyzu pozře rostlinu kontaminovanou bakulovirovými OB. OB s viriony se v nakažené larvě hmyzu dostanou do alkalického prostředí střední části střeva, kde je OB nestabilní a dochází k uvolnění virionu z okluzních tělísek. ODV infikují epiteliální buňky středního střeva a jsou zodpovědné za primární infekci hmyzu. V pozdní fázi se v infikovaných epiteliálních buňkách virion pomnoží a vzniknou BV, které opouští buňku basální membránou a šíří se prostřednictvím tracheálního systému a hemolymfy do celého těla. Bakulovirus kóduje apoptické supresory, aby se cyklus bakuloviru stihl dokončit před zničením buňky. Ve velmi pozdní fázi je skoro veškerá tkáň hmyzu infikovaná. Hmyz 18-72 hodin po infekci umírá, rozpadá se a umožňuje tak rozptýlení vzniklých okluzních tělísek s viriony a tím i další infekci hmyzu (Clem and Passarelli, 2013).

Bakulovirovou infekci buněk můžeme rozdělit na primární a sekundární. ODV se specificky připojuje k epiteliální membráně buňky hostitele a přímou fúzí dochází k uvolnění nukleokapsidy do cytoplasmy. Přenos skrz membránu epitelu usnadňují proteázy, které si virus kóduje. BV se naopak díky fúzogenním proteinům váže na buněčné receptory a dochází k endocytóze. V kyselém prostředí endosomu dojde ke změně konformace GP64 a obal viru zfúzuje s povrchem endosomu. Tím se uvolní nukleokapsida do cytoplasmy. Když poklesne syntéza glykoproteinu 64, klesne i virulence bakuloviru. Nebude docházet k pučení BV a tím pádem šíření sekundární infekce v hostiteli bude nižší (Knipe and Howley, 2007). Další kroky v infekci buňky způsobené oběma druhy virionů jsou stejné. Nukleokapsida putuje do jádra skrz

jaderné póry. Virová DNA se uvolní z nukleokapsidy a replikuje se. V pozdní fázi po replikaci DNA se syntetizují kapsidové strukturní proteiny, které jsou sestaveny do kapsidové struktury (Huang et al., 2017). Složky BV putují k plazmatické membráně, kde dochází ke spojení kapsidy s fúzogenními proteiny a procesem pučení získávají virový obal a opouštějí BV buňku. U ODV je to jiné. ODV zůstávají v jádře, kde získávají jaderný obal a krystalickou mřížku polyhedrinu. Vzniknou okluzní tělíska, které jsou z buňky uvolněny pomocí buněčné lyze (Knipe and Howley, 2007).



Obr.2: Životní cyklus bakulovirů (převzato z Knipe and Howley, 2007)

4.3. Využití bakulovirů

Bakuloviry mají omezený rozsah hostitelů a tím jsou hmyzí druhy, ve kterých se replikují. U savčích buněk je to odlišné, bakuloviry jsou schopné infikovat savčí buňky, ale nereplikují se v nich. Jsou ale schopny ovšem exprimovat geny pod savčím promotorem. Pro savčí buňky jsou bakuloviry bezpečné, nevyvolávají cytotoxicitu. Rekombinantní bakuloviry jsou snadno konstruovatelné a mají velkou kapacitu pro vložení cizorodé DNA (> 30 kb). To jsou důvody, proč se mohou používat jako expresní eukaryotické vektory (Li et al., 2009).

Významně jsou bakuloviry používány jako biologické pesticidy, které pomalu nahrazují pesticidy chemické, které mají neblahý dopad na životní prostředí a v neposlední řadě i na člověka. Navíc na chemické přípravky začíná být hmyz rezistentní. Proto se používají ekologicky nezávadné biopesticidy, jako jsou například viry, mikroorganismy, produkty odvozené od rostlin,

nebo živočichů (Beas-Catena et al., 2014). Pokusy s využitím bakulovirů jako biopesticidů proti lesním a zemědělským škůdcům začaly již od 19. století. První úspěšná aplikace bakulovirů jako biopesticidů ale byla až ve třicátých letech minulého století (Szewczyk et al., 2006). Jejich předností je, že jsou relativně bezpečné k životnímu prostředí, mají specifickou virulenci pouze pro hmyz, a nejsou tedy toxické pro obratlovce. Dále je to dostupnost bakulovirů a jejich možnost výroby ve velkém měřítku. U bakulovirů můžeme najít i nevýhody. Tím je pomalá rychlost usmrcení (dny), náchylnost na UV záření a vyšší náklady na výrobu (Beas-Catena et al., 2014). Bakulovirové pesticidy se také postupem času začaly upravovat a vkládat se do nich pro hmyz specifické toxiny nebo hormony (Knipe and Howley, 2007). Nejvíce se používá juvenilní hormon, který negativně ovlivňuje metamorfózu a zvyšuje rychlost usmrcení o 30 %. Nebo se zavádějí do bakulovirového vektoru geny toxinů ze škorpiónů, roztočů nebo pavouků, díky kterému se zvyšuje rychlost usmrcení až o 40 % (de Souza et al., 2007).

4.4. Expresní systémy bakulovirů

Nejvíce používané bakuloviry pro genovou expresi jsou *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) a *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). Principem bakulovirového expresního systému (BEVS) je výměna genu kódující virový polyhedrin za rekombinantní gen, jehož exprese je následně v infikovaných buňkách kontrolována silným polyhedrinovým promotorem. Dochází k vytvoření rekombinantního bakuloviru s požadovaným genem. Tento rekombinantní protein/produkt je poté produkován ve značném množství místo polyhedrinu, který se přirozeně vyskytuje v bakulovirech divokého typu (Thermofisher, 2002a). BEVS se používá pro produkci proteinů již více jak třicet let, ovšem teprve před deseti lety došlo ke schválení dvou veterinárních vakcín, které byly produkovány v tomto systému. Od té doby se schválilo dalších sedm vakcín a z toho byly čtyři pro humánní použití (Cervarix®, Provenge®, Glybera® a Flublok®) (Felberbaum, 2015).

Jako první používající vakcína založená na bakulovirovém vektoru byla Glybera®, která byla schválena roku 2012. Hned o rok později to byla vakcína Flublok®. Vakcína založená na bakulovirech má mnoho výhod. Je to například čistota vakcíny, protože neobsahuje žádné vaječné proteiny. Další výhodou je výroba vakcíny, která je mnohem méně časově náročná. (Cox and Hollister, 2009). Vakcíny odvozené od BEVS jsou také mnohem cenově dostupnější (Cox, 2012). Po namnožení bakulovirů v hmyzích buňkách jsou posttranslačně modifikovány podobným způsobem jako v savčích buňkách. Mohou být zvětšeny pro velkovýrobu biologických produktů (Thermofisher, 2002a).

4.4.1. Bac-to-bac

Bac-to-bac je expresní systém, který rychle a účinně vytváří rekombinantní bakuloviry. Byl vyvinut pracovníky ze společnosti Monsanto (Wolfson *et al.*, 2002). Hlavními složky Bac-to-bac systému je donorový plazmid, do kterého se vnáší gen zájmu, hostitelský kmen *E. coli* a transfekční sada ExpiFectamine™ SF, což je transfekční činidlo, které se používá při transfekci bacmidové DNA z *E. coli* do hmyzích buněk. Gen zájmu se klonuje do vektoru, který je vložen do kyvadlového vektoru bacmidu v *E. coli* (ThermoFisher, 2002b). Z *E. coli* se izoluje rekombinantní bacmidová DNA, která je transfekována do DNA hmyzích buněk, aby generovala rekombinantní bakuloviry (ThermoFisher, 2018). Genové kazety odvozené od bacmidu jsou málo stabilní a může dojít k jejich ztrátě (Felberbaum, 2015).

4.4.2. BacMam

Pokud je bakulovirus schopný dodávat geny do savčích kmenových nebo primárních buněk, ve kterých následně dochází k expresi genu pod savčím promotorem, tak mluvíme o technologii jménem BacMam. Princip této technologie je, že se vloží cílový gen za savčí promotor v bakuloviru. Rekombinantní viry jsou vzaty do savčích buněk endocytózou a migrují do jádra, kde probíhá exprese genu. Bacmid v savčích buňkách může obsahovat fluorescenční protein, díky kterému můžeme monitorovat vzniklé rekombinantní bakuloviry. Tato metoda je jednoduchá a není časově náročná. (“BacMam Technology Overview - CZ,” n.d.).

4.4.3. MultiBacMam

Tento systém je první, který umožňuje sestavit multiexpresní kazetu pod savčím promotorem pro expresi více proteinů v savčích buňkách. Tato technologie je odvozená od BacMam systému, využívá také savčích promotorů, ale navíc obsahuje VSV glykoprotein, který je vystaven na povrchu bakuloviru a zvyšuje transdukcí takto upraveného (pseudotypovaného) bakuloviru. Systém obsahuje také fluorescenční protein pro vizualizaci a monitorování exprese (“MultiBacMam™ Archives,” n.d.).

4.4.4. MultiBac

MultiBac je systém, který slouží k produkci více proteinů zároveň v hmyzích buňkách. Na rozdíl od MultiBacMamu nevyužívá savčích promotorů. Navržené geny se klonují do bacmidu

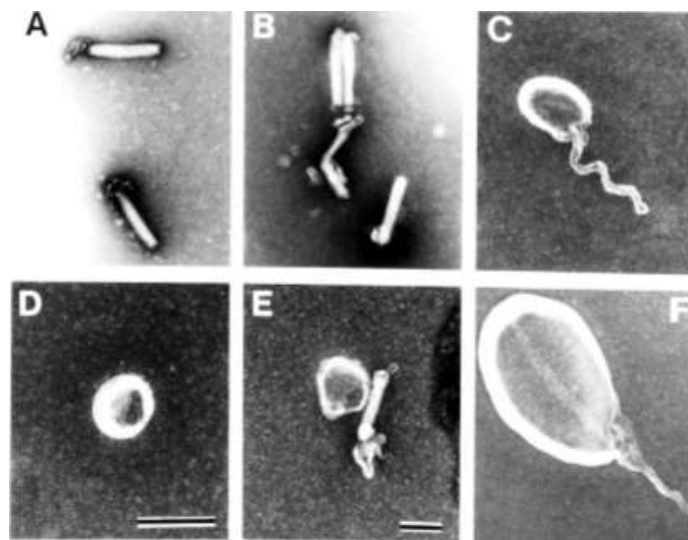
MultiBac, amplifikují se a dochází k expresi požadovaných proteinů v hmyzích buňkách. ("MultiBacTM Archives," n.d.).

5. Pseudotypování bakulovirů

Bakuloviry jsou známí hmyzí parazité infikující více jak 600 druhů členovců. Předpokládalo se, že jsou schopny infikovat pouze larvální stadia hmyzu. Hofmann et al., 1995 však prokázali, že rekombinantní bakulovirus obsahující časný promotor cytomegaloviru (*CMV*) je velice účinně endocytován lidskými hepatocyty a dokáže zajistit expresi rekombinantního reportérového genu. Reportér neboli reportérový gen je gen pro ověření, zda byl přenos určitého genu do buňky úspěšný. Jako reportérový gen byl použit luciferázový gen pod kontrolou *CMV* časného promotoru. Po inkubaci rekombinantního bakuloviru (*AcNPV-CMVTag*) s hepatocyty odvozenými od metastazující tkáň karcinomu tračníku, byla vysoká exprese luciferázové aktivity detekována v různých buněčných liniích jaterních buněk. Po tomto zjištění se expresní systém bakulovirů začal konstruovat s různými promotory, rekombinoval se a pseudotypoval za účelem zlepšení a větší efektivity dodávání genů do savčích buněk. Od té doby začal být vysoký zájem o bakulovirový expresní systém hlavně v oblasti vývoje vakcín a genové terapie (Li et al., 2009).

Ve snaze zdokonalit dodávání genů do buněk se bakulovirus také začal pseudotypovat. Nejznámější a nejvíce používaný je bakulovirus nesoucí ve svém obalu spolu s bakulovirovým glykoproteinem GP64 glykoprotein G viru vesikulární stomatitidy (*VSV-G*). Pseudotypovaný bakulovirus s G glykoproteinem VSV vykazuje stejný široký tropismus jako VSV, má také vysokou stabilitu, vyšší odolnost proti inaktivaci komponentu a vysokou účinnost transdukce. G glykoprotein vesikulární stomatitidy má významnou roli ve vazbě na membránu a následném vstupu do cílové buňky (Barsoum et al., 1997). Dlouhou dobu bylo zkoumáno, jaký buněčný receptor zprostředkovává vstup VSV do buňky. Až výzkum Finkelshtein et al., 2013 odhalil, že VSV infikuje buňky prostřednictvím receptorů LDL (*lipoproteiny o nízké hustotě*). LDLR jsou receptory složené z 839 aminokyselin zprostředkovávající po vazbě VSV na LDLR endocytózu. Členové LDLR jsou všudypřítomné a to také souvisí s širokým tropismem VSV. Barsoum et al., 1997 zkonstruovali rekombinantní bakulovirus obsahující expresní kazetu s G glykoprotein VSV a reportérem lacZ. Transdukce pseudotypovaného bakuloviru byla porovnávána s bakulovirem bez změněného obalu. Buňky lidského hepatomu byly transdukovány s vysokou účinností nezměněným bakulovirem, ale pseudotypovaný bakulovirus transdukoval buňky hepatomu s účinností desetkrát větší. Po přijmutí VSV-G na povrch bakuloviru došlo k morfologické změně bakuloviru z typicky tyčinkovitého vzhledu bakuloviru na oválnou strukturu. Pseudotypovaný bakulovirus s VSV-G infikoval i jiné buňky, které samotný bakulovirus nedokázal transdukovat a vyžadoval přítomnost VSV-G a také by mohly zvýšit

účinnost transdukce do savčích jaterních buněk *in vivo*. Informace, ke kterým došli v tomto výzkumu se uplatňují ve využití pseudotypovaných bakulovirů v genové terapii (Barsoum et al., 1997).



Obr.3: Porovnání wild type bakulovirů s pseudotypovanými bakuloviry

Na obrázku A a B jsou bakuloviry, které neobsahují VSV-G a mají tyčinkovitý tvar. Bakuloviry obsahující na svém povrchu VSV-G zobrazují obrázky C-F. Tyto pseudotypované bakuloviry změny svůj klasický tyčinkovitý tvar na oválný, který může obsahovat přívěsek na svém povrchu a může být zvětšený (převzato z(Barsoum et al., 1997).

Předchozí studie prokázaly, že GP64 je esenciální pro virus (Monsma et al., 1996). Zprostředkovává vazbu viru na receptor, membránovou fúzi, pučení virionů z buněčného povrchu a při deleci GP64 došlo k 98% snížení tvorby virionů. Ve studii Barsoum et al., 1997 pseudotypovaný bakulovirus obsahoval na svém povrchu jak bakulovirový GP64, tak VSV-G. Mangor et al., 2001 nahradili veškerý GP64 proteinem VSV-G. Takto změněný bakulovirus byl schopen nahradit některé funkce GP64, jako replikaci a produkci infekčních virionů, ale v nižší míře než bakulovirus s GP64. Vznikl tedy pseudotypovaný bakulovirus bez přítomnosti GP64 proteinu, který je možné použít v některých aplikacích genové terapie (Mangor et al., 2001).

Kaikkonen et al., 2006 pro zlepšení dodávání genů prostřednictvím bakulovirů vytvořili pseudotypovaný bakulovirus obsahující na povrchu GP64 s VSV-GED. VSV-GED je zkrácený G glykoprotein vesikulární stomatitidy obsahující pouze ektodoménu G-proteinu VSV o 21-aminokyselinách ve spojení s CTD (cytoplazmatická terminální doména z anglického cytoplasmic terminal domain) a TM (transmembránová doména z transmembrane domain) doménami VSV-G. Bakulovirus účinně začlenil VSV-GED do své membrány a byl ve vysoké míře transdukován i v několika buněčných liniích u buněk hmyzu a obratlovců. Nejenže počet transdukovaných buněk vzrostl, ale také úroveň exprese reportérového genu byla vyšší, a to jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Pro

objasnění, proč dochází ke zvýšení transdukce, zkoumali, jak probíhá po vstupu viru do buněk jejich uvolnění z endosomů v porovnání s divokým typem bakuloviru a bakulovirem pseudotypovaným VSV-G. Při $\text{pH} > 5,5$ nedocházelo k fúzi jak u pseudotypovaného bakuloviru s VSV-GED, tak ani u jednoho kontrolního vzorku. Kontrolní vzorek pseudotypovaných bakulovirů s VSV-G byl schopen fúze a tedy i infekce hmyzích buněk v $\text{pH} 6,2$. Membránová fúze u VSV-G probíhala v rozmezí $\text{pH} 5,8-6,2$. Zatímco u VSV-GED fúze membrán probíhala za stálého $\text{pH} 5,5$. Zvýšená transdukce pseudotypovaného bakuloviru VSV-GED, podle výzkumu Kaikkonen et al. souvisí se zvýšeným endosomálním uvolněním, který zkoumali pomocí látek monensinu a chloridu amonného. Tyto sloučeniny zabráňují okyselení endosomů, které je nutné pro fúzi bakulovirového obalu s membránou buňky. Ukázalo se, že i po aplikaci těchto dvou látek je VSV-GED schopen vykazovat částečnou transdukci buněk. Je tedy možné, že VSV-GED může napomoci urychlovat a zlepšovat fúzi endosomů (Kaikkonen et al., 2006).

Pseudotypování virů pomocí VSV-G má své výhody, pokud nám jde o tropismus v širokém spektru. Pro některé aplikace v genové terapii potřebujeme přenos omezit pouze na úzký specifický výběr buněk. Ve studii Schaubert et al., 2004 nepseudotypovali bakulovirus, ale naopak lentivirový vektor bakulovirovým obalovým glykoproteinem GP64. Zjistili, že takto pseudotypovaný lentivirus může účinně transdukovat řadu buněčných linií ovšem v omezenějším rozsahu než lentivirus s VSV-G. Prováděli mnoho výzkumů, kde srovnávali schopnost transdukce pseudotypovaných lentivirů s VSV-G a GP64 v různých buněčných liniích pocházejících i z odlišných zvířecích modelů. Ve většině případů došlo ke stejné nebo nemálo nižší transdukci u lentivirů s GP64. Ovšem u buněk hematopoetického původu byla míra transdukce lentiviru s GP64 velice nízká. To může být považováno za výhodu v případě, že transdukce těchto typů buněk není žádoucí. Nevýhodou je, že dochází k omezení použití tohoto viru v genové terapii. Pseudotypovaný lentivirus s GP64 glykoproteinem z bakuloviru poskytuje účinnou transdukci jak *in vitro*, tak *in vivo*, je stabilnější a bez cytotoxických účinků (Schaubert et al., 2004).

5.1. Bakuloviry jako nástroj v genové terapii

Principem genové terapie je výměna mutovaného genu za gen funkční, inaktivace genu, který není funkční, nebo zavedení nového genu do organismu, který pomůže bojovat s nemocí. Do těla vkládáme rekombinantní nukleovou kyselinu na nosiči, který může být DNA nevirový vektor nebo virový vektor. Nevirové nosiče DNA jsou schopny nést velké množství genů a vyvolávají menší imunotoxicitu, ale jejich účinnost přenosu genů je menší než virové vektory, které se používají častěji právě pro jejich větší účinnost. Mezi nejpoužívanější virové vektory v genové terapii patří lentivirové vektory odvozené od viru lidské imunodeficiency (HIV), adenoviry (AdV),

adeno-asociované viry (AAV), vektory odvozené od virů herpes simplex (HSV) (Wang and Gao, 2014). Obecně lze genovou terapii rozdělit na dvě kategorie. Na somatickou genovou terapii, která je založena na vkládání rekombinantní DNA do cílových buněk, které se nepředávají do dalších generací. Zatímco genová terapie v zárodečných liniích je terapie, kdy se vložená DNA přenáší do dalších generací. Současné zákony povolují pouze somatickou genovou terapii (Wirth et al., 2013). Nejvíce zaměřovanými orgány při genové terapii jsou játra a centrální nervový systém. V játrech dochází k mnoha metabolickým poruchám, které jsou dědičné, jako fenylketonurie, hemofilie, ale i virová a autonomní hepatitida (Ghosh et al., 2002).

Pomocí genového inženýrství lze zdokonalit funkci bakulovirů jako nosičů pro dodávání genů při genové terapii. Opět se zde tedy nabízí možnost úpravy virového obalu ve snaze změnit infekčnost a tropismus viru pomocí pseudotypování virové obálky bakuloviru s glykoproteinem G viru vesikulární stomatitidy. Změna V literatuře jsou také popsány případy, kdy byl bakulovirus pseudotypován s obalovými proteiny rhabdovirů (Wu et al., 2014). Takové úpravy by mohly bakuloviru omezit tropismus pouze na nervovou tkáň, nebo na hepatocyty, tedy jaterní buňky (Hofmann et al., 1995). Taktéž lze ovšem využít upraveného bakuloviru, který má na svém povrchu specifický vazebný ligand, např. který určuje dodání vektoru do cílové buňky (Mottershead et al., 2000; Ojala et al., 2001).

Bakulovirus má jednu velmi důležitou výhodu oproti vektorům odvozeným od savčích virů a to, že způsobuje velice nízkou cytotoxicitu a přitom má schopnost dodat geny do velkého množství buněčných linií u savců (Kost and Condreay, 2002). Huang et al., 2008 prokázali, že s využitím genové terapie můžeme snížit růst nádoru u rakoviny žaludku. Tuto aplikaci nemůžeme zatím použít u lidí, ale je úspěšně aplikována u hlodavců. Rakovina žaludku je jedna z nejběžnějších rakovin končících také smrtí. V počáteční fázi lze nádor chirurgicky odstranit, v pokročilém stádiu rakovina žaludku neodpovídá ani na chemoterapie, nebo na radioterapie (Sitarz et al., 2018). Ve studii Huang et al., 2008 se zaměřili na experimentální způsob léčení rakoviny žaludku, a to je léčení prostřednictvím genové terapie. Použili gen NES1 (z angličtiny normal epithelial cell specific-1), který má funkci jako tumor supresorový gen u rakoviny žaludku (Goyal et al., 1998). Vyvinuli bakulovirové plazmidy obsahující gen NES1 pod kontrolou CMV promotoru. Léčba nádoru se prováděla pomocí injekcí s 4×10^8 pfu Bac-NES1 každé tři dny. Výsledky ukázaly, že růst nádoru byl významně snížen ve skupině myši infikovaných Bac-NES1, a tedy tumor supresorový gen NES1 může inhibovat proliferaci nádorových buněk (Huang et al., 2008).

Další možnost využití rekombinantního bakuloviru v genové terapii rakoviny studovali Wang et al., 2006, kde se zabývali přesněji gliomy. Gliom je nádor mozku pocházející z gliových buněk, převážně astrocytů. Nejzávažnějším je gliom čtvrtého stupně, který je nevléčitelný.

Výzkum byl založen na vytvoření rekombinantního bakuloviru obsahující transkripční regulační sekvenci GFAP (z anglického glial fibrillary acidic protein), která v tomto systému řídila expresi genů pro difterické toxiny. GFAP je cytoskeletární protein patřící do skupiny proteinů intermediálních filament, které se podílejí na tkáňové a buněčné diferenciaci. Difterický toxin můžeme rozdělit na dva fragmenty, na fragment A a B. Fragment A je N-koncová část polypeptidu toxinu a má enzymovou aktivitu. Katalyzuje přenos ADP-ribosy na eukaryotický elongační faktor (EF2), tím se inaktivuje a zastaví se proteosyntéza a buňka uhynie. Fragment B zprostředkovává vazbu na receptory buněk (Honjo et al., 1968). Toho se využilo v této studii, kdy genová expresní kazeta kódovala difterický toxin A (DT-A) a tím docházelo k usmrcení gliových buněk a účinné inhibici růstu nádorových buněk gliomu v mozku experimentálních zvířat. Pro vysokou toxicitu bakteriálního toxinu DT-A byl použit promotor aktivní pouze v buňkách nádoru, tedy promotoru GFAP. Tento promotor je bohužel slabý, a proto byl použit zesilovač CMV, který podpořil a zesílil expresi genů a gen byl lemován invertovanými terminálními repeticemi (ITR) z adeno-asociovaného viru, který také podporuje expresi genu. Tím vznikl bakulovirový vektor Bac-CG/ITR-DTA. Byla vytvořena buněčná linie krysího gliomu značeného luciferázou pod promotorem CMV, která byla naočkována na obě strany myšího mozku. Po třech dnech se jedna strana mozku infikovala vektorem Bac-CG/ITR-DTA a druhá strana kontrolním vektorem. Výsledky ukázaly, že strana infikovaná Bac-CG/ITR-DTA vykazuje výraznou inhibici růstu gliomových buněk. V této studii se tedy nejednalo o pseudotypování, ale ukázalo se, že jsou bakulovirové vektory použitelné a dobře slučitelné s jinými virovými vektory jako je adeno-asociovaný vektor (Wang et al., 2006).

Bakulovirový vektor je slibným nástrojem také pro genovou terapii nervového systému. Studium Sarkis et al., 2000 zkoumali transdukcii bakulovirového vektoru do nervových buněk. Vytvořili vektor Bac-CMV-GFP obsahující zelený fluorescenční protein (GFP) pod kontrolou promotoru CMV. Účinnost transdukce byla zkoumána na dvou neuroblastomálních buněčných liniích (z toho jedna byla lidská buněčná linie neuroblastu) a na třech neneuronálních buněčných liniích. Výsledky ukázaly, že vektor je schopen vstoupit do buněčných linií, u kterých se dalo detekovat fluorescenční záření. Dále infikovali primární buňky z embryí a lidských mozků. U těchto buněk také významně docházelo k transdukcii buněk. Hlavní částí tohoto výzkumu byla přímá infekce mozků potkanů vektorem. I když byla transdukce mírná, pouze v místě jednoho milimetru od infekce a po několika týdnech vymizela, ukázalo se, že bakulovirový vektor je schopen transdukovat nervové buňky in vivo. Sarkis et al., 2000 tvrdí, že lze vyvinout bakulovirové vektory nové generace, které budou vyvolávat vyšší infekčnost a dlouhodobou expresi. Jako jednu ze strategií navrhl pseudotypování za využití obalu z neurotrofních virů, jako je například rhabdovirus, což by zvýšilo transdukcii do nervových buněk (Sarkis et al., 2000).

Bakulovirus by mohl přispět i k vývoji účinného vektoru pro genovou terapii cystické fibrózy. Cílem je proto zlepšit transdukcii lentivirových vektorů do epiteliálních buněk dýchacích

cest. Sinn et al., 2017 se proto zaměřili na hledání virových glykoproteinů, které určují receptorový tropismus vektorů pro dýchací epiteliální buňky. Vysokou expresi a vstup do těchto buněk vykazoval rekombinantní bakulovirus obsahující luciferázový gen pod promotorem CAG, což je hybrid složený z prvního enhanceru CMV, promotoru kuřecího β -aktinu a králíčího β -globinu (Shoji et al., 1997). Příznivé vlastnosti bakulovirových glykoproteinů GP64 zvyšují transdukcii bakulovirů do dýchacích epitelů. Transdukcii bylo dokonce možné zlepšit při navození mutace v GP64 genu (Sinn et al., 2017). V budoucích studiích se budou zabývat vyvinutím vektoru s regulátorem transmembránové vodivosti cystické fibrózy (CFTR).

Nejnovější výzkum využívající pseudotypovaných bakulovirů využili Graves et al., 2018, kteří se zabývali vylepšením bakuloviru pro genovou expresi v lidských buňkách pankreatických ostrůvků. Autonomní destrukce beta-buněk pankreatických ostrůvků vylučující inzulin způsobuje diabetes mellitus prvního stupně. Ten lze řešit každodenním podáváním injekce inzulinu nebo u horších případů transplantací pankreatických ostrůvků ("Pancreas Islet Transplantation for Patients With Type 1 Diabetes Mellitus," 2015). Po transplantaci dochází v některých případech k destrukci pankreatických ostrůvků někdy až o 50 % v důsledku imunitní odpovědi a mnoha buněčných mechanismů, především však ischemicko-reperfúzní poškození (IRI). Ischemicko-reperfúzní poškození je stav, kdy do orgánu po delší době opět spustíme krevní zásobu a molekulární kyslík je po obnovení zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou zodpovědné za vyvolání zánětu a následné poškození tkáně (Carden and Granger, 2000). Předtransplantační genová terapie prostřednictvím bakulovirů by mohla zlepšit výsledky transplantace. Experimentální bakulovirové vektory byly zkonstruovány tak, aby dodávaly geny do buněk pankreatických ostrůvků a zlepšovaly životaschopnost po jejich transplantaci. Pro výzkum, zda lze použít bakulovirový vektor v genové terapii pro expresi genů v pankreatických ostrůvcích, byl vytvořen expresní vektor CMV.EGFP^{HT}-VSV-G. Vektor obsahuje mutovaný gen fp25, který má posunutý čtecí rámec v kódující oblasti. Tato mutace nezvyšuje rychlost transdukce, ale zato zvyšuje produkci rekombinantních proteinů (Harrison and Summers, 1995), ve vektoru je označený HT. Pro kontrolu byl nejprve vzniklý vektor transdukován v buňkách lidských ledvin. Expres zeleného fluorescenčního proteinu (EGFP) pod kontrolou časného promotoru CMV byla detekována den po transdukcii a dále se expres s časem zvyšovala. Na buňkách lidských ledvin byla také zkoumána expres anti-apoptického genu B-buněčného lymfomu-2 (BCL2). Vektor CMV.BCL2^{HT} s mutací v fp25 vykazoval o 50% zvýšení produkce výtěžku. Zda jsou sestavené vektory schopné transdukce i jiných buněčných liniích bylo prokázáno na lidských pankreatických beta-buňkách. Důležité bylo, zda se anti-apoptický gen BCL2 bude exprimovat v buňkách pankreatu. Výsledky ukázaly, že vzniklé vektory BacMam s mutovaným fp25 jsou velkým příslibem pro zlepšení úspěšnosti transplantací buněk pankreatických ostrůvků. Bakulovirový vektor byl také pseudotypován s VSV-G, kdy tento

chimérický virus zvyšuje transdukci genů až 15krát. V tomto výzkumu chtějí vědci pokračovat a zabývat se dalšími studii zahrnující nahrazení zeleného fluorescenčního proteinu dalšími protizánětlivými geny (Graves et al., 2018).

5.2. Vakcinace s využitím pseudotypovaných bakulovirů

Bakuloviry jsou používány jako expresní systémy pro tvorbu vakcín a produkci antigenů. Rekombinantní bakuloviry jsou také schopny vyvolávat u imunizovaných jedinců vysokou buněčnou i humorální imunitní odpověď proti antigenům (Yang et al., 2007). Tvorba vakcín se provádí v různých postupech. V prvním případě jsou antigeny exprimovány a jsou obsaženy na povrchu bakuloviru. Principem je, že se cizí glykoprotein po expresi spolu s GP64 začlení na povrch bakuloviru. Virové částice samy o sobě jsou pak schopny vyvolat protilátkovou odpověď (Xu et al., 2008, 2009, 2011b; Yang et al., 2007). V druhém případě dochází k pseudotypování bakuloviru VSV-G, který zvyšuje transdukční účinnost a dopravuje gen kódující imunizační antigen do buňky pro jeho expresi. S tímto postupem přišel Wang et al., 2007, kdy zkonstruovali rekombinantní bakulovirus s VSV-G a silným cytomegalovirovým promotorem, který úspěšně expimoval proteiny v savčích buňkách. Byl také použit povrchový duální zobrazovací systém, kdy se do buňky vložily dva promotory, které řídily ko-expresi dvou genů a vystavení obou na obalu viru. Tento přístup se může používat pro vizualizaci daného genu, kdy použijeme jeden gen, u kterého pozorujeme expresi a druhý gen je použit jako indikátor, podle kterého zjišťujeme, zda nám k expresi a zobrazení na povrchu viru požadovaného genu vůbec došlo (Hu et al., 2006; Xu et al., 2012).

Probíhá mnoho studií zaměřených na výzkum vakcín založených na bakulovirech. Od některých vznikajících bakulovirových vakcín se opustilo z důvodu jiných efektivnějších a účinnějších vakcín. Ty, které mají svoji budoucnost ve využití, jsou zatím v předklinických studiích a musí proběhnout další výzkumu pro optimalizaci těchto vektorů.

5.2.1. Aujeszkyho choroba

Aujeszkyho choroba je respirační onemocnění zejména u prasat a způsobuje vysoké ekonomické ztráty v odvětví průmyslu s chovem prasat. Způsobuje ji virus pseudorabies (PrV), patřící do čeledi *Herpesviridae*. Může způsobovat potraty, vysokou úmrtnost u selat mladších jednoho měsíce, horečku a zácpy. Během virové infekce hraje zásadní roli hlavní obalový glykoprotein gB viru pseudorabies, který indukuje protilátkovou imunitní reakci (Zaripov et al., 1998).

Toho využili Aoki et al., 1999, kteří jako první popsali využití bakuloviru jako nástroj pro přímé očkování. Použili však silnější promotor, než je CMV, a to promotor CAG. Po vložení promotoru CAG a glykoproteinu gB do bakuloviru vznikl Bac-CAGgB. Po infekci buněčné linie prasečích ledvin (CPK) bylo zjištěno, že rekombinantní bakulovirus zajistil produkci proteinu PrV gB v CPK buňkách (i v různých dalších savčích buněčných liniích). Následně naočkovali i myši in vivo tímto rekombinantním bakulovirem. Výsledky ukázaly, že u infikovaných myši se indukovaly protilátky IgG proti PrV gB (Aoki et al., 1999). V dnešní době se však používají spíše oslabené a geneticky modifikované vakcíny, rozvíjejí se také markerové vakcíny, které umožňují rozlišit infikované od očkovaných zvířat (van Oirschot et al., 1986).

5.2.2. Virus prasečího reprodukčního a respiračního syndromu

Prasečího reprodukčního a respiračního syndromu (PRRS) je způsoben virem prasečího reprodukčního a respiračního syndromu patřícího do rodu *Arteriviridae*, která má jednovláknovou RNA. Způsobuje selhání reprodukce u dospělých prasat a respirační potíže u selat (Rossow, 1998).

Vědci Wang et al., 2007 se v této studii zaměřili na ORF5 a ORF6 kódující dva hlavní proteiny, a to na glykoprotein GP5 a membránový protein M. Do rekombinantního bakuloviru VSV-G byl vložen ORF5 a ORF6 a bakulovirus byl nazván Bac-VSV/G-ORF5m/ORF6. Tři skupiny myši byly infikovány intramuskulárně dávkami 100 ul PBS (fyziologický roztok pufovaného fosfátu) obsahujícím 1×10^8 , 1×10^9 a 1×10^{10} PFU Bac-VSV/G-ORF5m/ORF6. Jako kontrolní vzorky byly použity DNA vakcíny. Neutralizační protilátky byly sledovány ve třetím a šestém týdnu po primární infekci. Po třech týdnech byla detekována hladina protilátek, která se výrazně zvýšila po dalších třech týdnech, tedy v šestém týdnu. Bac-VSV/G-ORF5m/ORF6 významně vyvolaly buněčnou imunitu hlavně u dávek 1×10^9 a 1×10^{10} . Myši vykazovaly na dávce závislou imunitní odpověď po vakcinaci Bac-VSV/G-ORF5m/ORF6 a došlo u nich k produkci vysokých hladin neutralizačních protilátek a IFN- γ . Pseudotypované bakuloviry obsahující hlavní proteiny PRRS vyvolaly výrazně vyšší hodnoty neutralizačních látek než DNA vakcíny (Wang et al., 2007).

5.2.3. Prasečí circovirus typu 2

Prasečí circovirus typu 2 (PCV2) patří do čeledi *Circoviridae* mající ssDNA. Obecně prasečí circovirus je nejmenší autonomně se replikující virus v eukaryotických buňkách. Způsobuje syndrom multisystémového chřadnutí selat po odstavu (postweaning multisystemic wasting

syndrom (PMWS)), tedy klinické příznaky jako hubnutí, bledost kůže, anemie, respirační problémy a průjmy (Allan and Ellis, 2000).

Tímto problémem se zabývali Fan et al., 2008, kdy se zaměřili u tohoto neobaleného viru na kapsidový protein Cap, který je kódován ORF2 a snažili se navrhnout novou generaci vakcín proti PCV2. Do již dříve zmíněného BacVSV/G byl vložen ORF2 a došlo ke vzniku Bac-VSV/G-ORF2, který obsahoval VSV-G pod promotorem polyhedrinu a gen ORF2 kódující kapsidový protein PCV2 pod časným promotorem CMV s enhancerem. Imunizace myši rekombinantním bakulovirem probíhala ve dvou různých dávkách a to 100 μ l PBS obsahující 1×10^8 a 1×10^9 Bac-G-ORF2. Vzorky se odebíraly po primární imunizaci ve třetím a šestém týdnu. U obou dávek se výrazně zvedly neutralizační titry protilátek specifické pro PCV2 a v šestém týdnu opět vzrostly o více jak dvojnásobek. Rekombinantní bakulovirus byl schopen vyvolat specifickou imunitní odpověď u myši (Fan et al., 2008).

Navazující výzkum proběhl roku 2013, kdy vytvořili vakcínu založenou na duálním expresním systému proti PCV2. Nejprve zobrazili kapsidový Cap protein v obalu bakuloviru. Poté jim šlo o to, aby se kapsidový protein účinně exprimoval v savcích buňkách. V poslední řadě bakulovirus pseudotypovali s VSV-G. Zkonstruovali rekombinantní bakulovirus obsahující VSV-G pod promotorem p10 a expresní kazeta obsahující GP64 spolu s ORF2 byla pod duálním promotorem polyhedrinu a CMV. Cap protein byl obsažen na povrchu bakulovirové membrány. Takto vzniklými bakulovirovými vektory se imunizovaly myši. Vzorky séra byly z myši odebrány po třetím, šestém a devátém týdnu po primární imunizaci a vyhodnocovala se schopnost indukce imunitní reakce specifické proti PCV2. Už po prvních třech týdnech po primární infekci byla hladina protilátek proti PCV2 mnohem vyšší než kontrolní vzorky, jako byly např. samotný PBS, divoký typ bakuloviru a vektor exprimující pouze Cap protein. Hladiny specifických protilátek výrazně vzrůstala s přibývajícími týdny. V šestém týdnu po primární imunizaci byly také odebrány splenocyty z imunizovaných myši vzniklé rekombinantním bakulovirem. Splenocyty vykazovaly velké hladiny IFN- γ , tedy nespecifické imunitní odpovědi. Duální expresní systém bakuloviru je dobrým kandidátem na vakcínu proti PCV2 díky své bezpečnosti a finanční nenáročnosti (Ye et al., 2013).

5.2.4. Bivalentní vakcína proti PRRSV a PCV2

Pro tvorbu bivalentní vakcíny byly použity GP5 glykoprotein z PRRSV a Cap protein z PCV2, u kterých byla v předchozích studiích prokázána schopnost vyvolat neutralizační protilátky a ochranou imunitu v hostiteli. Ve studii Xu et al., 2012 zkonstruovali rekombinantní bakulovirus nesoucí, jak GP5 glykoprotein PRRSV, tak kapsidový protein PCV2 a oba byly schopny se úspěšně vystavit na bakulovirovém povrchu. U očkovanych

prasat po dvou a čtyřech týdnech došlo k produkci výrazně vysokých titrů protilátek specifických pro GP5 a Cap a také neutralizačních protilátek. Také zkoumali, jaká je reakce lymfocytů při imunizaci prasat. A u prasat imunizovaných bivalentní vakcínou se dospělo k velice kladným výsledkům. Prasata vykazovala buněčnou imunitní reakci. Podle dosavadních výsledků je možné uvažovat o bivalentní vakcíně jako o nové strategii vakcíny proti PRRVS a PCV2 (Xu et al., 2012).

5.2.5. Klasický mor prasat

Virus klasického viru prasat je obalený virus s ssRNA genomem (CSFV, z angl. Classical swine fever virus) patřící do čeledi *Flaviviridae*. Je to nejvýznamnější infekční onemocnění prasat, které může způsobovat velké ztráty v hospodářském průmyslu. Inkubační doba je 7-10 dní. Virus se přenáší prostřednictvím potkanů, krev sajícího hmyzu, i člověkem. Pozorované symptomy se odvíjejí od věku prasat, ale nejčastěji to jsou průjmy, zácpy, může docházet k ochrnutí a nervovým problémům. Klasický mor prasat můžeme rozdělit na akutní a chronický. U akutního průběhu nastává smrt druhý až třetí týden od infekce, u chronického po třech měsících (Moennig, 2000).

E glykoprotein je strukturní protein u čeledi *Flaviviridae* schopný vyvolat neutralizační protilátky a imunitní odpověď. Ve studii Xu et al., 2008 zkonstruovali rekombinantní bakulovirus exprimující glykoprotein E, který je zfúzovaný s transmembránovou a cytoplazmatickou terminální doménou proteinu GP64. Ukázalo se, že glykoprotein E byl vystaven nejen na rekombinantním bakuloviru, ale i na savčích buňkách, které byly infikovány tímto virem. A ukázalo se, že pseudotypovaný bakulovirus indukoval protilátky proti CSFV. Tento rekombinantní bakulovirus tedy úspěšně vyvolal imunitní odpověď proti CSFV (Xu et al., 2008).

V současné době je aplikována velice účinná atenuovaná vakcína. Také je dostupná vakcína založená na glykoproteinu E2 (van Rijn et al., 1996). Po jejich použití a při následné diagnostice onemocnění však nelze odlišit očkováná a infikovaná zvířata. Xu et al., 2009 se proto zaměřili na jiný protein, a to na nestrukturní NS3, který podle předchozích studií dokáže indukovat apoptózu (Xu et al., 2007). Zkonstruovali rekombinantní bakulovirus schopný exprimovat a vystavit NS3 protein na svém povrchu. Po imunizaci myši došlo k vysoké produkci titrů protilátek proti NS3. Cílem této studie bylo vystavení NS3 na povrchu rekombinovaného bakuloviru a schopnost použít tento bakulovirus jako diagnostický antigen rozlišující prasata infikovaná divokým typem moru prasat nebo atenuovanou vakcínou (Xu et al., 2009).

5.2.6. Vzteklna

Vzteklina je zoonóza, která je způsobena virem vztekliny (RABV), který je řazen do čeledi *Rhabdoviridae*. Způsobuje akutní onemocnění centrálního nervového systému u savců, tedy i u lidí. Očkování můžeme rozdělit na pre-expoziční a post-expoziční. Pre-expoziční jsou inaktivované vakcíny odvozené od buněčné kultury. Post-expoziční profylaxe se podává co nejdříve po kousnutí nakaženého zvířete (Fooks et al., 2014).

Vznikají nově navržené vakcíny proti vzteklině, které jsou zaměřené na glykoprotein viru vztekliny (RVG), který je schopen vyvolat neutralizační protilátky proti RABV. Počáteční studia vytvořily návrh vakcíny Bac-VSV/G-CMV-RABV/G. Myši byly infikovány různými dávkami. U nízkých dávek nám žádné neutralizační protilátky nevyvolaly, u vyšších dávek ano, ale až po druhé imunizaci. Dva týdny po první imunizaci nebyly detekovány žádné neutralizační látky. Poté byly myši infikovány opět různými dávkami vakcíny Bac-VSV/G-CMV-RABV/G a zkoumala se indukce T-buněk. Kontrolní očkování nevyvolalo žádnou proliferaci T buněk, zatímco u myši očkovaných Bac-VSV/G-CMV-RABV/G byla proliferace větší, ale byla závislá na dávce této vakcíny. Vakcína založená na rekombinantním bakuloviru nevyvolala tak silnou imunitní odpověď a pokud by se chtěla použít u lidí, muselo by být očkování několik a po velmi vysokých dávkách vakcíny (Huang et al., 2011).

Ve výzkumu Wu et al., 2014 zkonstruovali dva pseudotypované bakuloviry. Jeden pro účel testování, zda bude RVG účinně dodán do savčích buněk, druhý k indukci specifické imunitní odpovědi. První bakulovirus obsahoval expresní kazety RVG pod promotorem polyA a EGFP pod promotorem CMV. Druhý zkonstruovaný bakulovirus obsahoval RVG pod promotorem polyA a ještě jednu expresní kazetu, která exprimovala další RVG pod promotorem CMV. Vznikly tedy Bac-RVG/EGFP a Bac-RVG/RVG vektory. Prokázalo se, že Bac-RVG/EGFP zvyšují po transdukcii expresi EGFP. Hladina exprimovaných EGFP byla vyšší než u samotných bakulovirů Bac-EGFP exprimujících EGFP, ale tato hladina nepřesáhla množství EGFP, které byly exprimovány pseudotypovaným bakulovirem Bac-VSVG/EGFP. Z toho vyplývá, že pseudotypovaný bakulovirus zvýšil expresi EGFP, ale účinněji transdukuje buňky pseudotypovaný bakulovirus Bac-VSVG/EGFP. Druhý pseudotypovaný bakulovirus Bac-RVG/RVG se úspěšně zainkorporoval do částic virionu a také účinně expimoval RVG v savčích buňkách. Bac-RVG / RVG byl schopen vyvolat vysokou protilátkovou odpověď. Zaměřili se také na měření exprese IFN- γ , která byla nejvyšší u Bac-RVG/RVG s porovnáním kontrolních vektorů. Bac-RVG/RVG byla tedy rovněž schopná vyvinout buněčnou imunitní odpověď. Nejdůležitější část výzkumu se zaměřovala na analýzu schopnosti vyvolat ochranu myši, které byly infikovány virem vztekliny. Myši se infikovaly dva týdny po imunizaci. Zatímco u kontrolních vektorů, jako je Bac-VSVG/EGFP, vykazovaly myši příznaky

onemocnění, úbytek váhy nebo dokonce i smrt. Myši imunizované vakcínou Bac-RVG/RVG nevykazovali žádné úbytky hmotnosti ani příznaky onemocnění. Přežití u těchto myši bylo 100 %. Bac-RVG/RVG byl schopen vyvinout 100 % ochranu před letálním napadením vzteklinou u myši a je tedy schopným kandidátem pro vývoj nové vakcíny (Wu et al., 2014).

5.2.7. Japonská encefalitida

Japonská encefalitida (*JEV*) je virové onemocnění mozku, které způsobují viry z čeledi *Flaviviridae*. Vyskytuje se v oblastech Jižní a Východní Asie, Austrálie a Pacifiku. Přírodním přenašečem je komár rodu *Culex*, který se vyskytuje v oblastech se stojatými vodami. Divocí ptáci, domácí drůbež a prasata zde působí jako rezervoár (Solomon et al., 2000).

Jediná vakcína schválena WHO, je inaktivovaná vakcína Japonské encefalitidy z infikovaného myšního mozku nebo buněk ledvin křečka. Bohužel inaktivované vakcíny neposkytují dlouhodobou imunitní ochranu a jsou finančně velmi nákladné. Proto se usiluje o vytvoření nové bezpečné, účinnější a levnější vakcíny (Xu et al., 2011b). *Flaviviridae* mají RNA genom, který kóduje dohromady deset proteinů a tři z nich jsou hlavními imunogenními proteiny. Jsou to proteiny premembránový (prM), obalový (E) a NS1, na které je výhodné se zaměřit při vytváření nových vakcín (Li et al., 2009).

V prvním výzkumu nové vakcíny Li et al., 2009 použili pseudotypovaný bakulovirus Bac-G-E obsahující gen VSV-G umístěn pod kontrolou polyhedrinového promotoru a obalový protein E JEV pod kontrolou promotoru CMV. Zda je možné vyvolat specifickou humorální odpověď bylo zkoumáno na myších, které byly infikovány různými dávkami Bac-G-E. Po první imunizaci bylo detekováno pouze průměrné množství neutralizačních látek oproti skupině, která byla infikována inaktivovanou vakcínou vyvolávající u myši vysoké titry neutralizačních protilátek. Dále se zkoumala exprese IFN- γ u myši, kde nejvyšší hodnoty byly extrahovány z myši imunizovaných vyšší dávkou 1×10^{10} PFU Bac-G-E. Šest týdnů po primární imunizaci byly myši infikovány virem japonské encefalitidy a sledovala se u nich úmrtnost. Nejmenší úmrtnost byla pozorována u myši imunizovaných 1×10^{10} PFU Bac-G-E a u inaktivovaných vakcín. Schopnost přežití klesala se snižující se dávkou vakcíny Bac-G-E. Ukázalo se, že myši imunizované Bac-G-E jsou schopny vyvolat vyšší hladinu neutralizačních protilátek, která ale nepřesahuje hladinu vyvolanou inaktivovanými vakcínami. Schopnost indukovat IFN- γ byla ovšem vyšší u myši imunizovaných vyšší dávkou 1×10^{10} PFU Bac-G-E než u inaktivovaných vakcín. Vysoké titry IFN- γ a neutralizačních protilátek vykazovaly pouze vysoké dávky vakcíny (Li et al., 2009).

Lepších výsledků dosáhl výzkum Xu et al., 2011. Ti vytvořili rekombinantní bakulovirus BacSC-E, který expimoval glykoprotein E JEV zřizovaný s bakulovirovou GP64 transmembránovou doménou a cytoplazmatickou terminální doménou. Tento E glykoprotein byl vystaven jak na povrchu rekombinantního bakuloviru, tak na povrchu buněk, které byly infikovány virem. Myši byly imunizovány rekombinantním bakulovirem BacSC-E a kontrolními vzorky, které byly použity BacSC bez glykoproteinu E a PBS. Po dvou týdnech od aplikace primární vakcinace se u BacSC-E exprimovaly specifické protilátky. Kontrolní vzorky neprodukovaly žádné protilátky. Neutralizační protilátky byly detekovány u myši po dvou týdnech a výrazně se zvýšily po čtyřech týdnech od imunizace. Po primární imunizaci byly myši infikovány letální dávkou JEV a u myši imunizovaných BacSC-E byly stoprocentně chráněny a všechny myši přežily bez znatelných symptomů. U myši imunizovaných kontrolními látkami se symptomy objevily třetí den po infekci a následkem byla stoprocentní úmrtnost myši. Podobné výsledky vykazovala i imunizace prasat, kdy pseudotypované bakuloviry byly schopné vyvolat neutralizační protilátky. V této studii dosáhli slibných výsledků pro přípravu účinných vakcín proti JEV (Xu et al., 2011).

5.2.8. Západonilský virus

Západonilský virus (WNV z angl. West Nile Virus) je RNA virus z čeledi *Flaviviridae* stejně jako Japonská encefalitida. Způsobuje obávanou západonilskou horečku. Tato nemoc je přenášena po kousnutí infikovaným komárem rodu *Culex* ze slinných žláz. Nakažení jedinci mohou projít infekcí bez příznaků a tím u nich končí, to se stává u 80 %. Ovšem jestliže se u nakaženého replikuje virus dál, může proniknout do centrálního nervového systému a tím může způsobovat nevolnost, únavu, bolest končetin, obrnu periferních nervů a dokonce i smrt. Smrt nastává v 10 % nakažených, u kterých se projeví symptomy. Inkubační doba je 3-6 dnů od sání komára. Vakcína není zatím vyvinuta, jako prevence se doporučuje vakcinace proti chorobám způsobených virem čeledi *Flaviviridae* (Hubálek and Halouzka, 1999).

Vývojem vakcíny proti západonilské horečce se zabývali Zhu et al., 2012, kteří vytvořili rekombinantní bakulovirus schopný pod promotorem CMV exprimovat prM a E proteiny. Premembránový protein napomáhá správnému složení E proteinu (Lorenz et al., 2002), který je schopen vyvolat většinu neutralizačních protilátek a tedy stimuluje buněčnou a humorální odpověď organismu. Sestavili dva rekombinantní bakuloviry Bac-VSVG-prM/E a Bac-prM/E, které byly oba schopni vyvolat jak buněčnou, tak humorální imunitu. Infekce myši probíhala intramuskulárně a vzorky séra se odebíraly třetí a šestý týden po imunizaci. Pseudotypované bakuloviry Bac-VSVG-prM/E byly schopné indukovat vyšší titry protilátek než rekombinantní bakulovirus Bac-prM/E, ale ani jeden neindukoval takové množství titrů

protilátek proti WNV jako proteinová vakcína, která byla použita jako pozitivní kontrola. Ve svém výzkumu také prokázali, že lze při detekci specifických neutralizačních protilátek proti WNV detekovat také protilátky, které částečně neutralizují JEV. Dále měřily hladiny IFN- γ u myši imunizovaných Bac-VSVG-prM/E a Bac-prM/E. Naměřené hladiny vykazovaly vysoké titry IFN- γ . Pseudotypovaný bakulovirus Bac-VSVG-prM/E byl však schopen vyvolat vyšší množství IFN- γ , tím i vyšší buněčnou imunitu. Při infekci myši nedošlo k žádnému vyvolání toxicity, ani k žádnému úmrtí. Rekombinantní bakuloviry byly schopny exprimovat prM a E proteiny, indukovat vysoké hladiny IFN- γ , neutralizační protilátky a specifické protilátky proti WNV. Úspěšně také dokázaly vyvolat buněčnou i humorální imunitu u myši, proto by mohly být tyto rekombinantní bakuloviry použity jako nová vakcína (Zhu et al., 2012).

5.2.9. Slintavka a kulhavka

Slintavka a kulhavka (*Foot and Mouth Disease (FMD)*) je onemocnění sudokopytníků, především skotu, prasat a ovcí. Onemocnění způsobuje virus slintavky a kulhavky (*Foot and Mouth Disease virus (FMDV)*) patřící do čeledi *Picornaviridae* a může mít za následek velké ekonomické ztráty (Cao et al., 2011). Virus FMD můžeme najít v sedmi různých sérotypech: sérotyp O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia-1. Diagnostika se provádí na základě klinických příznaků, jako zvýšená teplota, tvorba puchýřů a aftů na sliznici a nose (Jamal and Belsham, 2013).

V současné době se používá inaktivovaná vakcína FMDV, u které je omezená úspěšnost a obava o bezpečnost dobytka. Proto se Cao et al., 2011 zabývali výzkumem nové vakcíny s pseudotypovaným bakulovirovým systémem.

Ve studii Cao et al., 2011 se zaměřili na dva rekombinantní bakuloviry pseudotypované zkráceným glykoproteinem VSV-G, tedy VSV-GED. Jeden obsahoval kapsidový protein FMDV pod kontrolou CMV. Druhý obsahoval také kapsidový protein FMDV spolu s T buněčným epitopem. Epitopy T lymfocytů jsou rozpoznávány širokým spektrem povrchových glykoproteinů MHC třídy II. Epitopy mohou zlepšit imunogenicitu nových vakcín (Liang et al., 1999). Oba tyto vektory byly účinně transdukovány do buněk a úspěšně expimovaly protein VSV-GED. Poté byla zkoumána jejich schopnost vyvolat humorální imunitní odpověď. Myši byly očkovány těmito pseudotypovanými bakuloviry do svalu a pozorovali se hladiny vyvolaných protilátek specifických pro FMDV ve třetím a sedmém týdnu po imunizaci. Oba dva pseudotypované vektory vyvolávaly střední hladiny neutralizačních titrů protilátek, zatímco inaktivovaná vakcína, která zde působila jako kontrolní vzorek vykazovala vysoké množství titrů neutralizačních protilátek, jak ve třetím, tak v sedmém týdnu po imunizaci. Poté byly myši usmrceny a měřila se u nich hladina

produkce IFN-y ze splenocytů. Nejvyšších hladin IFN-y vykazovaly myši infikované pseudotypovaným bakulovirem s T epitopem. Závěrem této práce je, že pseudotypované bakuloviry exprimující spolu s kapsidovým proteinem FMDV i imunogen T buněk dokáží vyvolat vyšší buněčnou imunitu oproti inaktivovaným vakcínám, které ale vyvolávají na rozdíl od nich vyšší humorální imunitu (Cao et al., 2011).

5.2.10. Drůbeží burzitida

Burzitida je infekční onemocnění (zkratka IBDV) jejíž původcem je virus z rodu *Avibirnavirus* z čeledi *Birnaviridae*. Jsou dva druhy burzitidy a to IBDV1, který způsobuje právě burzitidu u drůbeže a IBDV2, který není infekční a nezpůsobuje žádné onemocnění. Virus se u drůbeže vylučuje trusem, takže pokud je chov ve velkém počtu, může se snadno přenášet prostřednictvím přímého kontaktu, kontaminované vody nebo krmivem. Nemoc může vypuknout u kuřat mladších tří týdnů v tzv. subklinické infekci. Je to bezpříznakový stav, jejíž následek je, že si kuřata nedokážou vytvořit protilátky, dochází k destrukci B a T lymfocytů a tedy k celkovému oslabení a trvalému snížení imunity. Akutní, tedy klinická infekce se projevuje u kuřat starých tři až šest týdnů. Typický je zánět váčkovité výchlípkovy kloaky, tedy burzy. Dochází ke změně barvy burzy a ke krvácení do jejích stěn, a tedy k otoku a zvětšování. To souvisí s poruchami kálení, močení a kulhání. Pokud do týdne neuhynou, dochází k rychlému uzdravení. Úmrtnost je závislá na virulenci viru, může být pětiprocentní, ale také dvacetiprocentní. Infekční burzitida nelze léčit. Možné je použít preventivní očkování, které je ale složité, protože musí předcházet vyšetření a určení hladin protilátek v konkrétním chovu kuřat ("Infekční burzitida drůbeže," 2018).

Jediným proteinem u IBDV je VP2, který je schopný vyvolat imunitní ochranu a indukci neutralizačních protilátek. Ve studii Xu et al., 2011a vytvořili rekombinantní bakulovirus exprimující fúzovaný gen VP2 s TM a CTD doménou GP64. Pomocí western blotu bylo dokázáno, že se VP2 úspěšně vystavuje na povrchu bakuloviru. Po vakcinaci kuřat BacSC-VP2 došlo k významnému zvýšení neutralizačních titrů. Skupina kuřat byla infikována virulentním virem způsobující nemoc IBDV. Příznaky se objevily 3 dny po infekci a následně došlo k úmrtí. Kuřata předem očkováná BacSC-VP2 a poté infikovaná virulentním virem vykazovala symptomy, ale v daleko menší míře a všechna přežila. Tato rekombinantní bakulovirová vakcína může být použita po dalších studiích a testech jako potenciální vakcína proti infekční burzitidě kuřat (Xu et al., 2011a).

5.2.11. Ptačí chřipka

Ptačí chřipka (AI z anglického Avian influenza) je RNA virus patřící do čeledi *Orthomyxoviridae*. Na počátku 21. stoletím byla ptačí chřipka velkým problémem jak pro drůbeží průmysl, tak i pro samotné lidstvo. Epidemii ptačí chřipky způsobil AIV, který má hlavní obalový proteiny neuraminidázu (NA) a hemagglutinin (HA), na které je dobré se zaměřit při vývoji nových vakcín (Baigent et al., 1999; Oxford and Lambkin, 1998).

V této studii Yang et al., 2007 zkonstruovali dva rekombinantní bakuloviry a pozorovali jejich schopnost přenosu, vyvolání imunitní odpovědi a schopnosti exprese transgenů. Zaměřili se na obalový protein HA, který je hlavním imunogenem vyvolávající imunitní odpověď. Zvolili HA z podtypu H5N2, který není tak patogenní jako podtyp H5N1 ptačí chřipky. První rekombinantní bakulovirus Bac-HA exprimoval HA, který byl zfúzován s vlastní cytoplazmatickou doménou a druhý bakulovirus Bac-HA64 exprimující HA s cytoplazmatickou doménou odvozenou od bakulovirového glykoproteinu GP64. U obou těchto složených vektorů se jako reportérový gen použil zelený fluorescenční protein, který byl exprimován pod kontrolou časného cytomegalovirového promotoru. Jako kontrolní vektor byl sestaven pouze bakulovirus exprimující EGFP (*Bac-CE*). U obou chimérických bakulovirů byly úspěšně zobrazeny HA i HA64 na povrchu obalu. Také se potvrdilo, že oba rekombinantní bakuloviry neovlivňují pučení viru. Tyto vzniklé vektory se lišily ve schopnosti transdukce do savčích buněk. Po infekci čtyř buněčných savčích linií rekombinantními bakuloviry se ukázalo, že vyšší expresi EGFP vyvolával Bac-HA64. Pro zjištění, zda pseudotypované bakuloviry mohou být využity jako vakcíny a jestli jsou schopné vyvolat u jedince imunitní odpověď, byly infikovány dvě skupiny myši vektory Bac-HA a Bac-HA64 a jako negativní kontrola byly využity vektory Bac-CE. Pseudotypované bakuloviry ukázaly, že jsou schopné vyvolat funkční protilátky proti hemagglutininu ptačí chřipky. Bac-HA64 vyvolávali ovšem mnohem vyšší titry protilátek než Bac-HA. Jak se předpokládalo, u kontrolního vektoru Bac-CE nebyly detekované žádné protilátky. Vědci věří, že je to nový příslib pro novou vakcínu proti pandemii ptačí chřipky (Yang et al., 2007).

5.2.12. Virus chřipky

O pár let dříve se také vědci pokoušeli o vytvoření vakcíny proti letální infekci způsobené virem chřipky. Vložili celý gen hemagglutininu (HA) z viru chřipky H1N1 do bakulovirového vektoru pod kontrolou CAG promotoru, aby exprimoval gen hemagglutininu. Myši byly infikovány BacCAG-HA a kontrolní dávkou dvakrát v rozestupu dvou týdnů od sebe. Byli infikováni instramsukulární cestou nebo intranasální dávkou $1,1 \times 10^8$ PFU. Po druhé infekci čekali tři týdny a poté infikovali myši letální dávkou $5,6 \times 10^5$ PFU viru chřipky. Indukci IgG

a IgA kontrolovali tři dny po první imunizaci. Zjistili, že hladiny titrů jsou vyšší u myši infikovaných intramuskulární cestou než u myši infikovaných intranasální cestou. Dvacátý první den po druhé imunizaci byly myši infikovány letální dávkou chřipky. Větší ochranu před letální dávkou viru chřipky způsobil vektor BacCAG-HA podávaný intranasální cestou. Zajímavé bylo, že samotné bakuloviry, které byly podávány myším jako kontrolní vzorky intranasální cestou, byly schopné vyvolat také imunitní odpověď, i když ne v takové míře jako BacCAG-HA. Tedy infikované myši BacCAG-HA, tak i kontrolní dávka divokého typu Bac intranasální cestou, vyvolávají imunitní reakci a stoprocentní přežití myši. Je tedy možné, že samostatný bakulovirus vyvolává aktivaci vrozené imunity, díky GP64 s vysokým obsahem manózy. Receptory pro manózu jsou exprimovány primárně na makrofázích a dendritických buňkách a tím můžou indukovat vrozenou imunitní odpověď (Abe et al., 2003). V tomto případě se nejednalo o pseudotypované bakuloviry, protože HA se nevystavoval na obalu bakuloviru. HA se pouze expimoval pod správným promotorem do savčích buněk a vyvolal savčí imunitní odpověď.

5.2.13. Toxoplasma gondie

Toxoplasma je intracelulární parazitický prvok, jehož mezipřenositel je teplokrevný živočich a definitivním hostitelem jsou kočkovité šelmy. U lidí, speciálně u těhotných žen, může způsobit narození postiženého dítěte a u lidí nakažených HIV může způsobovat záněty mozku (Winstanley, 1995).

Je vyvinuto několik vakcín proti toxoplazmóze, ale jen málo je schváleno pro používání z důvodu bezpečnosti, nebo malého účinku vakcíny (Bhopale, 2003). Výzkum Fang et al., 2010 se zaměřil na povrchový protein SAG1 toxoplasmy gondii, u kterého byla prokázána imunogenita. Pseudotypovaný bakulovirus s VSV-G zvyšuje efektivitu genového přenosu a zvyšuje odolnost proti inaktivaci. Proto také tento pseudotypovaný bakulovirus Bac-VSV/G použili pro svůj výzkum a vložili do něj gen pro protein SAG1. Vznikl tedy pseudotypovaný virus Bac-G-SAG1. Myši byly infikovány intramuskulárně různou dávkou 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} Bac-G-SAG1 ve 100 μ l PBS. Po třech týdnech po primární imunizaci zjistili, že myši infikované dávkou 1×10^{10} Bac-G-SAG1 produkují vyšší hladiny protilátek, než myši infikované 1×10^8 Bac-G-SAG1. Při zkoušce měření množství cytokinů, IFN- γ u myši, který zprostředkovávají buněčnou imunitu, byly detekovány vyšší hladiny IFN- γ u myši imunizovaných 1×10^{10} a 1×10^9 Bac-G-SAG1. V jednom z posledních testů bylo podáno myším 10^3 trachyzoitů z vysoce virulentní toxoplasmy gondii. Trachyzoit je rychle se množící forma toxoplasmy, která se množí nepohlavní cestou v jakékoliv tkáni. Prostřednictvím tohoto testu zkoumali, jaká doba přežití bude u imunizovaných myši. Nejenže nejsilnější ochrana

myši, tedy nejdelší doba přežití po podání trachyzoitů, byla u dávky 1×10^{10} Bac-G-SAG1, tedy $17,12 \pm 1,12$ dnů, ale bylo také dosaženo 50% přežití u myši. Zatímco u ostatních dávek se doba přežití prodloužila o $9,06 \pm 0,49$ dnů u dávky 1×10^8 Bac-G-SAG1 a u 1×10^9 Bac-G-SAG1 dávky $11,06 \pm 1,08$ dnů, ale nakonec všechny myši zahynuly. Rekombinantní pseudotypovaný bakulovirus je tedy schopen vyvolat imunitní odezvu a zvýšit dobu přežití u myši napadených letálními trachyzoity *Toxoplasma gondii* (Fang et al., 2010).

5.2.14. HIV

HIV je obalený RNA virus, patřící do čeledi *Retroviridae*. Virus přežívá v tělních tekutinách, nejčastější přenos je tedy prostřednictvím krve, spermatu, nebo poševním sekretem. HIV nakažených lidí je na světě 3 600 000 lidí a každým rokem zhruba milión zemře. HIV (z anglického human immunodeficiency virus) je onemocnění, které oslabuje imunitní systém člověka a ten je pak náchylný k dalším oportunním nemocem, jako je zápal plic, některé typy rakovin nebo tuberkulóza. Pokud je lidská imunita již natolik slabá u HIV pozitivních lidí, že nedokáže bojovat s těmito nemocemi, vyvíjí se u nich AIDS (z anglického Acquired immune deficiency syndrome) ("HIV / AIDS," 2017).

Virus HIV můžeme rozdělit na dva druhy, a to na HIV-1 a HIV-2. Způsobují podobné symptomy u lidí, ale HIV-1 je agresivnější typ. Z HIV pozitivních lidí je nakaženo právě 95 % typem HIV-1. Pro léčbu se používají antiretrovirové terapeutika, která mohou snížit onemocnění, úmrtnost a předcházet přenosu HIV u jedinců. Tato antivirotika jsou celoživotní záležitostí a jsou nákladná. Neodstraní však nikdy zcela HIV infekci. Vývoj vakcíny je náročný z důvodu mnoha subtypů odlišujících se proteinovým obalem viru. Stále se ovšem vytváří nové vektory a nové vakcíny, které by bojovaly proti infekci HIV (Hsu and O'Connell, 2017).

Jeden z nových přístupů vyzkoušel Kaneko et al., 2006. Zaměřili se na typ HIV-1 a na jeho inhibici replikace s využitím bakulovirového vektoru. Zkonstruovali bakulovirový vektor schopný exprimovat U5-ribozym, který silně inhibuje replikaci HIV. Jeden vektor obsahoval také glykoprotein VSV-G, který účinněji infikoval a transdukoval buňky. Vznikli jim tedy vektory Bac/tRNA^{Met}-U5-Rz a Bac/VSV-G/tRNA^{Met}-U5-Rz. Hela CD4⁺ buňky infikovali těmito vektory a po dvou dnech od infekce odebrali vzory. Výsledky ukázaly, že bakulovirus pseudotypovaný VSV-G je schopen exprimovat vyšší titry ribozymu U5 než vektor bez expresní kazety VSV-G. Po získání této informace o expresi ribozymu U5 zjišťovali, zda může docházet k inhibici replikace HIV-1. Ukázalo se, že exprimující ribozym U5 má schopnost naštěpit mRNA, a tím se může zredukovat funkční mRNA HIV-1 na post-transkripční úrovni (Kaneko et al., 2006).

5.2.15. Malárie

Malárie je akutní onemocnění způsobené parazitickými prvky Plasmodii. Způsobuje vysokou mortalitu a morbiditu a to 1-2 miliónů úmrtí ročně, především v tropických a subtropických oblastech. Přenašečem je komár anopheles, který je nakažený plasmodiem. Díky globálnímu oteplování se malárie dostává do oblastí, která se malárie nevyskytovala.

Snaha o vytvoření vakcíny je velká. Yoshida et al., 2009 vytvořili duální bakulovirový expresní systém vystavující na své povrchu *Plasmodium berghei* circumsporozoite (CSP) a po transdukci do savčí buňky je schopen ho exprimovat. Rekombinantní bakulovirus Bac-Dual-PbCSP obsahuje fúzogenní gen PbCSP-gp64 pod kontrolou duálního promotoru CMV a bakulovirového polyhedrinu. Myši byly infikovány třikrát po třítydenních intervalech Bac-Dual-PbCSP a kontrolními vzorky, jako byly bakuloviry divokého typu a Rekombinantní bakulovirus obsahující na svém povrchu protein malárie hlodavců. Zjistilo se, že indukované hladiny specifických IFN-y byly výrazně vyšší u myší infikovaných Bac-Dual-PbCSP. Poté se myši, které byly třikrát imunizovány nechaly pokousat infikovanými komáry. Ve skupině 33 myší imunizovaných Bac-Dual-PbCSP všechny přežily (Yoshida et al., 2009).

V tomto případě se nejednalo o pseudotypování bakulovirů. Protein, který obsahoval bakulovirus nepocházel z viru, ale z parazitického prvoka.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo poskytnout přehled o možnostech a způsobech pseudotypování u bakulovirů. Bakuloviry jsou DNA obalené viry, které se replikují v hmyzích buňkách, a proto jsou hojně využívány jako biopesticidy v lesním i zemědělském průmyslu. Bakuloviry se nereplikují v transdukovaných savčích buňkách a vyvolávají v nich nízkou cytotoxicitu. Do bakuloviru lze vložit velké množství cizí DNA a jsou snadno konstruovatelné. Tato pozitiva dávají bakuloviru výhodné postavení a využití v genové terapii i v produkci vakcín.

Bakuloviry lze využívat jako velkokapacitní expresní systémy zejména pro produkci rekombinantních proteinů a podjednotkových vakcín. Samotné bakulovirové viriony však mohou sloužit jako nosiče antigenů pro vakcinace nebo jako dopravní systémy pro zajištění účinné exprese terapeutických genů v cílových buňkách. V obou případech je výhodné využívat možnosti pseudotypování. Pseudotypováním bakuloviru docílíme vystavení antigenu na povrchu virionu, změny tropismu, nebo zvýšení transdukce do buňky. Ve vakcinologii lze pak všechny tyto přístupy kombinovat.

Vznik vakcín na základně bakulovirové platformy je velkou nadějí do budoucna, jak pro očkování člověka, tak i zvířat. Zatím jsou ale všechny výzkumy v předklinické studii a je potřeba dalších studií a výzkumů.

7. Seznam použité literatury:

- Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y., Takaku, H., 2003. Baculovirus Induces an Innate Immune Response and Confers Protection from Lethal Influenza Virus Infection in Mice. *J. Immunol.* 171, 1133–1139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1133>
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine Circoviruses: A Review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14. <https://doi.org/10.1177/104063870001200102>
- Anderson, D.B., Laquerre, S., Goins, W.F., Cohen, J.B., Glorioso, J.C., 2000. Pseudotyping of Glycoprotein D-Deficient Herpes Simplex Virus Type 1 with Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Enables Mutant Virus Attachment and Entry. *J. Virol.* 74, 2481–2487.
- Aoki, H., Sakoda, Y., Jukuroki, K., Takada, A., Kida, H., Fukusho, A., 1999. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet. Microbiol.* 68, 197–207. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00110-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00110-8)
- Au, S., Wu, W., Panté, N., 2013. Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame. *Viruses* 5, 1885–1900. <https://doi.org/10.3390/v5071885>
- BacMam Technology Overview - CZ [WWW Document], n.d. URL <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/pathway-biology/cellular-pathway-analysis/bacmam-system/bacmam-technology-overview.html> (accessed 4.14.19).
- Baigent, S.J., Bethell, R.C., McCauley, J.W., 1999. Genetic Analysis Reveals That Both Haemagglutinin and Neuraminidase Determine the Sensitivity of Naturally Occurring Avian Influenza Viruses to Zanamivir in Vitro. *Virology* 263, 323–338. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9931>
- Barsoum, J., Brown, R., McKee, M., Boyce, F.M., 1997. Efficient Transduction of Mammalian Cells by a Recombinant Baculovirus Having the Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 8, 2011–2018. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.17-2011>
- Beas-Catena, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E., n.d. BACULOVIRUS BIOPESTICIDES: AN OVERVIEW. *J Anim Plant Sci* 12.
- Bhopale, G.M., 2003. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect.* 5, 457–462. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00048-0)
- Blissard, G.W., Wenz, J.R., 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* 66, 6829–6835.
- Briggs, J.A.G., Wilk, T., Fuller, S.D., 2003. Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *J. Gen. Virol.* 84, 757–768. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18779-0>
- Cao, Y., Lu, Z., Sun, P., Fu, Y., Tian, F., Hao, X., Bao, H., Liu, X., Liu, Z., 2011. A pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of foot-and-mouth disease virus and a T-Cell immunogen shows enhanced immunogenicity in mice. *Virol. J.* 8, 77. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-77>
- Carden, D.L., Granger, D.N., 2000. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *J. Pathol.* 190, 255–266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6)
- Carnell, G.W., Ferrara, F., Grehan, K., Thompson, C.P., Temperton, N.J., 2015. Pseudotype-Based Neutralization Assays for Influenza: A Systematic Analysis. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00161>
- Choppin, P.W., Compans, R.W., 1970. Phenotypic Mixing of Envelope Proteins of the Parainfluenza Virus SV5 and Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 5, 609–616.
- Clem, R.J., Passarelli, A.L., 2013. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. *PLoS Pathog.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003729>
- Cox, M.M.J., 2012. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 30, 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>

- Cox, M.M.J., Hollister, J.R., 2009. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, New Cell for New Vaccines III 37, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.014>
- Cox, M.M.J., Patriarca, P.A., Treanor, J., 2008. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine. *Influenza Other Respir. Viruses* 2, 211–219. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00053.x>
- Cronin, J., Zhang, X.-Y., Reiser, J., 2005. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 5, 387–398.
- de Souza, M.L., Krol, E., Szewczyk, B., n.d. Baculoviruses: A Safe Alternative in Pest Control? 8.
- Fan, H., Pan, Y., Fang, L., Wang, D., Wang, S., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S., 2008. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *J. Virol. Methods* 150, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.011>
- Fang, R., Feng, H., Nie, H., Wang, L., Tu, P., Song, Q., Zhou, Y., Zhao, J., 2010. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model. *Vaccine* 28, 1803–1807. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.005>
- Felberbaum, R.S., 2015. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* 10, 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., Rubinstein, M., 2013. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>
- Fooks, A.R., Banyard, A.C., Horton, D.L., Johnson, N., McElhinney, L.M., Jackson, A.C., 2014. Current status of rabies and prospects for elimination. *The Lancet* 384, 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62707-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5)
- Gelderblom, H.R., 1996. *Structure and Classification of Viruses*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Ghosh, S., Parvez, Md.K., Banerjee, K., Sarin, S.K., Hasnain, S.E., 2002. Baculovirus as Mammalian Cell Expression Vector for Gene Therapy: An Emerging Strategy. *Mol. Ther.* 6, 5–11. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0643>
- Goyal, J., Smith, K.M., Cowan, J.M., Wazer, D.E., Lee, S.W., Band, V., 1998. The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res.* 58, 4782–4786.
- Graves, L.P., Aksular, M., Alakeely, R.A., Ruiz Buck, D., Chambers, A.C., Murguia-Meca, F., Plata-Muñoz, J.-J., Hughes, S., Johnson, P.R.V., Possee, R.D., King, L.A., 2018. Improved Baculovirus Vectors for Transduction and Gene Expression in Human Pancreatic Islet Cells. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10100574>
- Harrison, R.L., Summers, M.D., 1995. Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *J. Gen. Virol.* 76, 1451–1459. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-6-1451>
- Hefferon, K.L., Oomens, A.G.P., Monsma, S.A., Finnerty, C.M., Blissard, G.W., 1999. Host Cell Receptor Binding by Baculovirus GP64 and Kinetics of Virion Entry. *Virology* 258, 455–468. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9758>
- HIV / AIDS [WWW Document], 2017. URL <https://www.lekari-bez-hranic.cz/hiv-aids> (accessed 5.3.19).
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., Strauss, M., 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10099–10103.
- Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O., Kato, I., 1968. Diphtheria Toxin-dependent Adenosine Diphosphate Ribosylation of Aminoacyl Transferase II and Inhibition of Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* 243, 3553–3555.
- Hsu, D.C., O'Connell, R.J., 2017. Progress in HIV vaccine development. *Hum. Vaccines Immunother.* 13, 1018–1030. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1276138>

- Hu, Y.C., Luo, Y.L., Ji, W.T., Chulu, J.L.C., Chang, P.C., Shieh, H., Wang, C.Y., Liu, H.J., 2006. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. *J. Virol. Methods* 135, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.023>
- Huang, A.S., Besmer, P., Chu, L., Baltimore, D., 1973. Growth of Pseudotypes of Vesicular Stomatitis Virus with N-Tropic Murine Leukemia Virus Coats in Cells Resistant to N-Tropic Viruses. *J. Virol.* 12, 659–662.
- Huang, H., Xiao, S., Qin, J., Jiang, Y., Yang, S., Li, Tingting, Gao, Y., Li, Z., Li, Tiansong, Su, X., Ruan, Y., Xu, F., Wang, H., Chen, H., Xia, X., 2011. Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice. *Arch. Virol.* 156, 753–758. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0909-4>
- Huang, W., Tian, X.-L., Wu, Y.-L., Zhong, J., Yu, L.-F., Hu, S.-P., Li, B., 2008. Suppression of gastric cancer growth by baculovirus vector-mediated transfer of normal epithelial cell specific-1 gene. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 5810. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5810>
- Huang, Z., Pan, M., Zhu, S., Zhang, H., Wu, W., Yuan, M., Yang, K., 2017. The Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus ac83 Gene Contains a cis-Acting Element That Is Essential for Nucleocapsid Assembly. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02110-16>
- Hubálek, Z., Halouzka, J., 1999. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 643–650.
- Infekční burzitida drůbeže, 2018. . MVDr Tereza Ježková. URL <http://zverolekarka.com/infekcni-burzitida-drubeze/> (accessed 4.17.19).
- Jamal, S.M., Belsham, G.J., 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res.* 44, 116. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-116>
- Kaikkonen, M.U., Rätty, J.K., Airene, K.J., Wirth, T., Heikura, T., Ylä-Herttuala, S., 2006. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* 13, 304–312. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302657>
- Kaneko, H., Suzuki, H., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., Takaku, H., 2006. Inhibition of HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector-transduced ribozyme in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 1220–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.184>
- Knipe, D.M., Howley, P.M., 2007. *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kost, T.A., Condreay, J.P., 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol.* 20, 173–180. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01911-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01911-4)
- Li, Y., Ye, J., Cao, S., Xiao, S., Zhao, Q., Liu, X., Jin, M., Chen, H., 2009. Immunization with pseudotype baculovirus expressing envelope protein of Japanese encephalitis virus elicits protective immunity in mice. *J. Gene Med.* 11, 57–65. <https://doi.org/10.1002/jgm.1271>
- Liang, X., Munshi, S., Shendure, J., Mark, G., Davies, M.E., Freed, D.C., Montefiori, D.C., Shiver, J.W., 1999. Epitope insertion into variable loops of HIV-1 gp120 as a potential means to improve immunogenicity of viral envelope protein. *Vaccine* 17, 2862–2872. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00125-5)
- Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X., Helenius, A., 2002. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* 76, 5480–5491. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5480-5491.2002>
- Makkonen, K.-E., Airene, K., Ylä-Herttuala, S., 2015. Baculovirus-mediated Gene Delivery and RNAi Applications. *Viruses* 7, 2099–2125. <https://doi.org/10.3390/v7042099>
- Mangor, J.T., Monsma, S.A., Johnson, M.C., Blissard, G.W., 2001. A GP64-Null Baculovirus Pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus G Protein. *J. Virol.* 75, 2544–2556. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2544-2556.2001>
- Moennig, V., 2000. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.* 73, 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00137-1)
- Monsma, S.A., Oomens, A.G., Blissard, G.W., 1996. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.* 70, 4607–4616.
- Morizono, K., Chen, I.S.Y., 2011. Receptors and tropisms of envelope viruses. *Curr. Opin. Virol.* 1, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.001>

- Mottershead, D.G., Alfthan, K., Ojala, K., Takkinen, K., Oker-Blom, C., 2000. Baculoviral Display of Functional scFv and Synthetic IgG-Binding Domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 84–90. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3264>
- MultiBacMamTM Archives, n.d. . Geneva Biotech. URL https://geneva-biotech.com/product_category/mammalian-cell-expression/multibacmam/ (accessed 4.14.19).
- MultiBacTM Archives, n.d. . Geneva Biotech. URL https://geneva-biotech.com/product_category/insect-cell-expression/multibac/ (accessed 4.14.19).
- Ojala, K., Mottershead, D.G., Suokko, A., Oker-Blom, C., 2001. Specific Binding of Baculoviruses Displaying gp64 Fusion Proteins to Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 777–784. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5048>
- Oxford, J.S., Lambkin, R., 1998. Targeting influenza virus neuraminidase—a new strategy for antiviral therapy. *Drug Discov. Today* 3, 448–456. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(98\)01241-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(98)01241-0)
- Pancreas Islet Transplantation for Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Clinical Evidence Review, 2015. . *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* 15, 1–84.
- Pearson, M.N., Rohrmann, G.F., 2002. Transfer, Incorporation, and Substitution of Envelope Fusion Proteins among Members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (Insect Retrovirus) Families. *J. Virol.* 76, 5301–5304. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5301-5304.2002>
- Pickl, W.F., Pimentel-Muinos, F.X., Seed, B., 2001. Lipid Rafts and Pseudotyping. *J. Virol.* 75, 7175–7183. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.7175-7183.2001>
- Pidre, M.L., Ferrelli, M.L., Haase, S., Romanowski, V., 2013. Baculovirus Display: A Novel Tool for Vaccination. *Curr. Issues Mol. Virol. - Viral Genet. Biotechnol. Appl.* <https://doi.org/10.5772/55572>
- Rossow, K.D., 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Pathol.* 35, 1–20. <https://doi.org/10.1177/030098589803500101>
- Sanders, D.A., 2002. No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 437–442. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00374-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00374-9)
- Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J.-L., Edelman, L., Mallet, J., 2000. Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-derived vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 14638–14643. <https://doi.org/10.1073/pnas.260472897>
- Schauber, C.A., Tuerk, M.J., Pacheco, C.D., Escarpe, P.A., Veres, G., 2004. Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells *in vivo* and show tropism restriction against hematopoietic cell types *in vitro*. *Gene Ther.* 11, 266–275. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302170>
- Shoji, I., Aizaki, H., Tani, H., Ishii, K., Chiba, T., Saito, I., Miyamura, T., Matsuura, Y., 1997. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* 78, 2657–2664. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2657>
- Sinn, P.L., Hwang, B.-Y., Li, N., Ortiz, J.L.S., Shirazi, E., Parekh, K.R., Cooney, A.L., Schaffer, D.V., McCray Jr, P.B., 2017. Novel GP64 envelope variants for improved delivery to human airway epithelial cells. *Gene Ther.* 24, 674–679. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.78>
- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G.J.A., Maciejewski, R., Polkowski, W.P., 2018. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag. Res.* 10, 239–248. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>
- Solomon, T., Dung, N.M., Kneen, R., Gainsborough, M., Vaughn, D.W., Khanh, V.T., 2000. Japanese encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 405–415. <https://doi.org/10.1136/jnnp.68.4.405>
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., Lobo de Souza, M., 2006. Baculoviruses — re-emerging biopesticides. *Biotechnol. Adv.* 24, 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.001>
- ThermoFisher[on-line]in vitrogen,2002a[cit.05.05.2019],
URL:<http://tools.thermoFisher.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>

- Thermofisher[on-line]invitrogen, 2002b[cit.05.05.2019], URL:https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/710_01985_BactoBac_bro.pdf
- Thermofisher[on-line]gibco, 2018[cit.05.05.2019], URL:https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0000414_BactoBacExpressionSystem_UG.pdf
- van Oirschot, J.T., Rziha, H.J., Moonen, P.J.L.M., Pol, J.M.A., van Zaane, D., 1986. Differentiation of Serum Antibodies from Pigs Vaccinated or Infected with Aujeszky's Disease Virus by a Competitive Enzyme Immunoassay. *J. Gen. Virol.* 67, 1179–1182. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-6-1179>
- van Rijn, P.A., Bossers, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J.M., 1996. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J. Gen. Virol.* 77, 2737–2745. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2737>
- Wang, C.-Y., Li, F., Yang, Y., Guo, H.-Y., Wu, C.-X., Wang, S., 2006. Recombinant Baculovirus Containing the Diphtheria Toxin A Gene for Malignant Glioma Therapy. *Cancer Res.* 66, 5798–5806. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4514>
- Wang, D., Gao, G., 2014. STATE-OF-THE-ART HUMAN GENE THERAPY: PART I. GENE DELIVERY TECHNOLOGIES. *Discov. Med.* 18, 67–77.
- Wang, S., Fang, L., Fan, H., Jiang, Y., Pan, Y., Luo, R., Zhao, Q., Chen, H., Xiao, S., 2007. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 25, 8220–8227. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.069>
- Winstanley, P., 1995. Drug treatment of toxoplasmic encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Postgrad. Med. J.* 71, 404–408.
- Wirth, T., Parker, N., Ylä-Herttuala, S., 2013. History of gene therapy. *Gene, 50 years of gene therapy - a contribution of Waclaw Szybalski to science and humanity* 525, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
- Wu, Q., Yu, F., Xu, J., Li, Y., Chen, H., Xiao, S., Fu, Z.F., Fang, L., 2014. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Vet. Microbiol.* 171, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.037>
- Wolfson huji[on-line]invitrogen, 2002[cit. 05.05.2019], URL:<http://wolfson.huji.ac.il/expression/bac.pdf>
- Xu, H., Hong, H.-X., Zhang, Y.-M., Guo, K.-K., Deng, X.-M., Ye, G.-S., Yang, X.-Y., 2007. Cytopathic Effect of Classical Swine Fever Virus NS3 Protein on PK-15 Cells. *Intervirology* 50, 433–438. <https://doi.org/10.1159/000113467>
- Xu, X.-G., Chiou, M.-T., Zhang, Y.-M., Tong, D.-W., Hu, J.-H., Zhang, M.-T., Liu, H.-J., 2008. Baculovirus surface display of Erns envelope glycoprotein of classical swine fever virus. *J. Virol. Methods* 153, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.07.019>
- Xu, X.-G., Tong, D.-W., Chiou, M.-T., Hsieh, Y.-C., Shih, W.-L., Chang, C.-D., Liao, M.-H., Zhang, Y.-M., Liu, H.-J., 2009. Baculovirus surface display of NS3 nonstructural protein of classical swine fever virus. *J. Virol. Methods* 159, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.013>
- Xu, X.-G., Tong, D.-W., Wang, Z.S., Zhang, Q., Li, Z.-C., Zhang, K., Li, W., Liu, H.-J., 2011a. Baculovirus Virions Displaying Infectious Bursal Disease Virus VP2 Protein Protect Chickens Against Infectious Bursal Disease Virus Infection. *Avian Dis.* 55, 223–229. <https://doi.org/10.1637/9597-111210-Reg.1>
- Xu, X.-G., Wang, Z.-S., Zhang, Q., Li, Z.-C., Ding, L., Li, W., Wu, H.-Y., Chang, C.-D., Lee, L.-H., Tong, D.-W., Liu, H.-J., 2012. Baculovirus as a PRRSV and PCV2 bivalent vaccine vector: Baculovirus virions displaying simultaneously GP5 glycoprotein of PRRSV and capsid protein of PCV2. *J. Virol. Methods* 179, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.023>

- Xu, X.-G., Wang, Z.-S., Zhang, Q., Li, Z.-C., Zhao, H.-N., Li, W., Tong, D.-W., Liu, H.-J., 2011b. Baculovirus surface display of E envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity of the displayed proteins in mouse and swine models. *Vaccine* 29, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.045>
- Yang, D.-G., Chung, Y.-C., Lai, Y.-K., Lai, C.-W., Liu, H.-J., Hu, Y.-C., 2007. Avian Influenza Virus Hemagglutinin Display on Baculovirus Envelope: Cytoplasmic Domain Affects Virus Properties and Vaccine Potential. *Mol. Ther.* 15, 989–996. <https://doi.org/10.1038/mt.sj.6300131>
- Ye, Y., Cheng, X., Zhang, J., Tong, T., Lin, W., Liao, M., Fan, H., 2013. Induction of robust immunity response in mice by dual-expression-system-based recombinant baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Virol. J.* 10, 316. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-316>
- Yoshida, S., Kawasaki, M., Hariguchi, N., Hirota, K., Matsumoto, M., 2009. A Baculovirus Dual Expression System-Based Malaria Vaccine Induces Strong Protection against *Plasmodium berghei* Sporozoite Challenge in Mice. *Infect. Immun.* 77, 1782–1789. <https://doi.org/10.1128/IAI.01226-08>
- Zaripov, M.M., Morenkov, O.S., Siklodi, B., Barna-Vetro, I., Gyöngyösi-Horvath, A., Fodor, J., 1998. Glycoprotein B of Aujeszky's disease virus: topographical epitope mapping and epitope-specific antibody response. *Res. Virol.* 149, 29–41. [https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(97\)86898-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(97)86898-7)
- Závada, J., 1982. The Pseudotypic Paradox. *J. Gen. Virol.* 63, 15–24. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-63-1-15>
- Závada, J., 1972. Pseudotypes of Vesicular Stomatitis Virus with the Coat of Murine Leukaemia and of Avian Myeloblastosis Viruses. *J. Gen. Virol.* 15, 183–191. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-15-3-183>
- Zhu, B., Ye, J., Lu, P., Jiang, R., Yang, X., Fu, Z.F., Chen, H., Cao, S., 2012. Induction of antigen-specific immune responses in mice by recombinant baculovirus expressing premembrane and envelope proteins of West Nile virus. *Virol. J.* 9, 132. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-132>